

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie



Mgr. Petra Lišková

Bakteriální RTX proteiny a jejich vazebná místa pro vápník
Bacterial RTX toxins and their calcium-binding sites

Disertační práce

Školitel: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praze, 27.6.2018

Poděkování:

Nebetyčnou chválu a dík pět chci všem těm, kdož krušné chvíle ulehčili, dobrým slovem, radou posvětili konání, i radostné okamžiky svedli sdílet. Prvně na půdě zdejší, Laboratoře fyziologie bakterií Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, svému školiteli, doc. RNDr. Ivovi Konopáskovi, CSc., za odborné vedení a ochrannou ruku, zejména pak RNDr. Radovanovi Fišerovi, PhD., jehož rozhledu hranice leží snad až v nedohlednu, Lucii Jánské, která vládne přízračně uměním psychohygieny, všem milým kolegům za všechno a také za skvělé kávové dýchánky. Vděk se sluší vyjádřit též celému kolektivu Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů, Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., v čele s prof. Ing. Petrem Šebem, CSc., také Ing. Ladislavovi Bumbovi, PhD., a Ing. Tomášovi Waldovi, PhD., kteří mi umožnili tuto zajímavou práci vypracovávat, mnoho se zde naučit a nezdary snášet. Poděkování též patří Mgr. Janu Sýkorovi, PhD., z Oddělení biofyzikální chemie Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v. v. i., za odbornou pomoc s měřením zamrazeného proteinu a obětavé dolévání dusíku do kryostatu. Nekonečná vděčnost nechť navěky plyne mé rodině, mámě a bábině, a jmenovat za co všechno by nemělo konce.

Tato práce vznikala v letech 2009 až 2018 v rámci grantového projektu: GA UK č. 354611.

Abstrakt

Protein FrpC je produkováný bakterií *Neisseria meningitidis* v lidském hostiteli. Tento protein je charakteristický přítomností RTX domény, která jej řadí do stejnojmenné rodiny bakteriálních toxinů. Protein FrpC vykazuje unikátní autokatalytickou štěpící aktivitu, kterou zajišťuje 177 aminokyselin dlouhá část (SPM, Self-Processing Module). Bez navázaného Ca^{2+} zaujímá SPM neuspořádanou strukturu. Po vazbě iontu se protein sbalí a je schopen vykonat enzymatickou aktivitu. Analýza struktury sbaleného SPM by mohla odhalit funkční souvislosti vazby iontu a autokatalytického sestřihu. Bohužel řešení struktury SPM pomocí NMR se ukázalo být velmi obtížné kvůli dlouhé nestrukturované části sekvence uvnitř SPM.

Předmětem této práce se tedy stal popis SPM pomocí fluorescenčních metod, charakterizace vazby iontu do SPM, tak i strukturních změn, které se v průběhu vazby Ca^{2+} odehrávají. Byla stanovena disociační konstanta vazby kovového iontu do SPM, $K_D \sim 17 \mu\text{M}$, která se nachází v koncentračním rozmezí Ca^{2+} , kdy dochází ke sbalování SPM proteinu ($1\text{--}20 \mu\text{M}$). Součástí pochopení struktury SPM bylo zjištění, že obě tryptofanová rezidua Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉ v SPM interagují jak s navázanými ionty, tak spolu navzájem. Pro tento účel byly použity plně funkční varianty SPM s jedním tryptofanem, W451F a W519F, a luminiscenční analog vápníku, terbium (Tb^{3+}). Měřením rezonančního přenosu energie (FRET) z Trp na Tb^{3+} byla určena vzdálenost 6 \AA , která ve sbaleném SPM proteinu dělí Trp₄₅₁ a navázaný iont Tb^{3+} . Součástí této práce je také metodický náhled do vlastností Tb^{3+} , jehož absorpční vlastnosti jsou proměnné podle toho, je-li navázáno v hydrofobním vazebném místě, či volně v roztoku. Pochopení vlivu elektrostatické interakce mezi dvěma tryptofany na terciární strukturu proteinů pomocí geometrických analýz dostupných konfigurací Trp-Trp z proteinových struktur z PDB databáze umožnilo odůvodněně navrhnout konfiguraci Trp-Trp v rámci SPM.

Klíčová slova: auto-katalytické štěpení, RTX proteiny, FrpC protein, vazebné místo pro vápník, vápník, terbium, *Neisseria meningitidis*

Abstract

FrpC protein produced by *Neisseria meningitidis* in a human host belongs to the family of bacterial RTX toxins due to the presence of RTX domain. FrpC possesses a calcium-dependent auto-catalytic cleavage activity which is localized within its 177 amino-acids long segment Self-Processing Module (SPM). As the SPM is naturally intrinsically disordered protein without bound Ca^{2+} , the calcium binding is crucial for SPM folding which is followed by the auto-catalytic processing. The elucidation of the SPM structure may be the key step for understanding of enzymatic and biological function. The structure of folded SPM itself can be characterized only with difficulties due to the presence of flexible loop according to preliminary NMR data. The subject of this work is the description of SPM using fluorescence methods, characterization of ions binding to SPM and structural changes occurring during Ca^{2+} binding.

In this work, the ion binding properties of SPM segment and its ion-induced folding was characterized. It was found that the dissociation constant K_D of 17 μM coincided with the folding of SPM into the native calcium-bound state which occurs in the concentration range between 1 and 20 μM Ca^{2+} . In the attempt to characterize the structure of ion binding site, the fully active single tryptophan mutants W451F and W519F together with Tb^{3+} , a luminescent analog of Ca^{2+} , were used. Due to the FRET between tryptophan and Tb^{3+} as donor and acceptor, respectively, the determination of the 6 Å distance between bound Tb^{3+} and 451W tryptophan residue of SPM was possible. The other part of this work is also a methodical insight to the properties of Tb^{3+} ion usage, whose absorption properties vary while bound in a hydrophobic binding site or located in the solvent. Understanding the influence of electrostatic interactions between two tryptophan in the tertiary structure of proteins by geometric analysis of the possible Trp-Trp configurations from the protein structures from the PDB database enables to discover the most probable Trp-Trp configurations within the SPM protein.

Keywords: auto-catalytic cleavage, RTX protein, FrpC protein, calcium-binding sites, calcium, terbium, *Neisseria meningitidis*

OBSAH:

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
OBSAH:.....	6
Seznam zkratk.....	9
1 Úvod.....	10
2 Literární přehled.....	12
2.1 Proteinové struktury vázající Ca^{2+}	12
2.1.1 „EF-hand“ proteiny vázající vápník.....	13
2.1.2 Bakteriální RTX proteiny.....	14
2.2 Protein FrpC bakterie <i>Neisseria meningitidis</i>	14
2.2.1 Předpovězená vazebná místa pro Ca^{2+} v proteinu FrpC, mimo RTX doménu – „EF-hand“.....	16
2.2.2 SPM – Self-processing module.....	17
2.3 Elektrostatická π - π interakce (Trp-Trp interakce).....	19
3 Materiál a metodika.....	21
3.1 Přístrojové vybavení, chemikálie a ostatní materiál.....	21
3.1.1 Přístrojové vybavení.....	21
3.1.2 Seznam použitých chemikálií a ostatního materiálu.....	22
3.1.3 Použité roztoky a pufrы.....	23
3.1.4 Použitá kultivační média.....	26
3.1.5 Použité bakteriální kmeny.....	26
3.2 Metody a pracovní postupy.....	27
3.2.1 Exprese, izolace a purifikace proteinu SPM.....	27
3.2.1.1 Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA.....	27
3.2.1.2 Produkce proteinu v 500 ml třepané kultuře.....	27
3.2.1.3 Izolace a purifikace proteinu SPM.....	28
3.2.1.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.....	29
3.2.1.5 Syntetický „AFQ“ peptid.....	29
3.2.2 Kontrola enzymatické aktivity proteinu SPM.....	30
3.2.2.1 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	30
3.2.2.2 Denzitometrické stanovení štěpných produktů GST-SPM.....	30
3.2.3 Stanovení vazebných parametrů proteinu SPM pro kovové ionty pomocí Tb^{3+}	31
3.2.3.1 Měření fosforescenčních emisních a excitačních spekter Tb^{3+} při titraci proteinu SPM $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$	32

3.2.3.2	Vyhodnocování intenzity emise Tb^{3+} z titračních křivek pomocí Hillových funkcí.....	32
3.2.3.3	Odhad počtu navázaných Tb^{3+} iontů na molekulu SPM.....	33
3.2.4	Vytěsnění iontů Tb^{3+} z vazebných míst proteinu kompeticí s Ca^{2+} ionty.....	33
3.2.5	Stanovení nenavázaného Ca^{2+} při titraci proteinu SPM Ca^{2+} ionty.....	34
3.2.6	Sbalování proteinu SPM po vazbě iontů do vazebných míst.....	34
3.2.6.1	Absorpční spektra W_{451} a W_{519} v proteinu SPM.....	36
3.2.6.2	Měření fluorescenčních emisních spekter Trp a stanovení pozice emisního maxima.....	36
3.2.6.3	Spektrální dekonvoluce emisních spekter Trp ve wt SPM při titraci proteinu SPM Tb^{3+}	38
3.2.7	Časově rozlišená fluorescence Trp v SPM.....	39
3.2.7.1	Měření časově rozlišené fluorescence Trp.....	39
3.2.7.2	Stanovení efektivity Försterova rezonančního energetického přenosu (FRET) a výpočet vzdálenosti donor-akceptor.....	41
3.2.8	Anizotropie fluorescence Trp v SPM.....	42
3.2.8.1	Perrinovo vynesení.....	43
3.2.8.2	Časově nerozlišená (steady-state) anizotropie fluorescence.....	44
3.2.8.3	Časově rozlišená anizotropie fluorescence v $-73\text{ }^{\circ}\text{C}$	44
3.2.8.4	Výpočet úhlu mezi tranzitními dipóly donoru a akceptoru energie při rezonančním přenosu energie.....	46
3.3	Analýza konfigurace tryptofanů v proteinech se známou strukturou publikovaných v databázi PDB.....	46
3.3.1	Popis molekuly indolu a její zasazení do souřadnicového systému pro výpočet úhlů.....	46
4	Výsledky.....	48
4.1	Izolace aktivního rekombinantního proteinu SPM.....	48
4.1.1	Enzymatická aktivita proteinů SPM.....	48
4.1.2	Kontaminace při izolaci proteinu SPM.....	49
4.2	Konformační změny wt SPM po vazbě Ca^{2+} sledované pomocí fluorescence Trp.....	51
4.3	Charakterizace vazebných míst proteinů SPM pro ionty.....	52
4.4	Ionty Tb^{3+} obsazují stejná vazebná místa jako ionty Ca^{2+}	55
4.4.1	Enzymatická aktivita SPM je zachována i po navázání iontů Tb^{3+}	56
4.5	Konformační změny wt SPM indukované vazbou iontů Tb^{3+} sledované pomocí fluorescence Trp.....	57
4.6	Konformační změny mutantních SPM, indukované vazbou iontů Ca^{2+} a Tb^{3+} , sledované pomocí fluorescence Trp.....	58
4.6.1	Změna intenzity fluorescence Trp v proteinech SPM během sbalování po vazbě Ca^{2+} nebo Tb^{3+}	60

4.7 Určení vzdálenosti mezi tryptofany v SPM a navázaným iontem Tb^{3+} pomocí rezonančního energetického přenosu (FRET).....	62
4.7.1 <i>Excitační spektra Tb^{3+} iontů v roztoku a navázaných na protein</i>	63
4.7.2 <i>Časově rozlišená intenzita fluorescence Trp v SPM</i>	64
4.8 Dekonvoluce emisních spekter Trp ve wt SPM.....	67
4.9 Steady-state anizotropie Trp v SPM a Perrinovo vynesení.....	70
4.10 Rámcové určení vzdálenosti a dihedrálního úhlu mezi dvěma Trp ve wt SPM.	72
4.11 Analýza konfigurace tryptofanů v proteinech se známou strukturou publikovaných v databázi PDB.....	77
5 Diskuse.....	80
6 Souhrn.....	87
7 Seznam publikací.....	88
7.1 Prvoautorské publikace.....	88
7.2 Spoluautorské publikace.....	88
7.3 Publikace v recenzním řízení.....	89
Příloha 1: „Probing the Ca^{2+} assisted π - π interaction during Ca^{2+} -dependent protein folding“.....	90
Příloha 2: „Transmembrane segments of complement receptor 3 do not participate in cytotoxic activities but determine receptor structure required for action of <i>Bordetella</i> adenylate cyclase toxin“.....	91
Příloha 3: „Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in <i>Bacillus subtilis</i> “.....	92
Příloha 4: „Anti-adhesive properties of nanocrystalline diamond films against <i>Escherichia coli</i> bacterium: Influence of surface termination and cultivation medium“.....	93
Příloha 5: „Diamond nanoparticles suppress lateral growth of bacterial colonies“.....	94
Příloha 6: „Simple way to detect Trp to Tb^{3+} resonance energy transfer in calcium-binding peptides using excitation spectrum“.....	95
Příloha 7: „Daptomycin pore formation and stoichiometry depends on membrane potential of target membrane“.....	96
8 Seznam citované literatury.....	97
9 Přílohy.....	103

Seznam zkratek

Aa	aminokyselina
a. u.	arbitrary unit (bezrozměrná jednotka)
BSA	bovinní sérový albumin
cps	counts per second (počet fotonů za sekundu)
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FIR	fluorescence intensity ratio (poměr intenzity fluorescence)
FRET	Försterův rezonanční energetický přenos
FrpC	železem regulovaný protein C (ferric-regulated protein C)
FWHM	full width at half maximum (pološířka v polovině maxima)
GST	glutathio-S-transferáza
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranozid
Da	Dalton (g/mol)
LED	light-emitting diode (elektroluminiscenční dioda)
LB	Luria-Bertani (kultivační médium)
NMR	nukleární magnetická rezonance
OD	optická denzita
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDB	Protein data bank (primární databáze 3-D struktur makromolekul)
QY	quantum yield (kvantový výtěžek)
RTX	opakované sekvence v toxinu (repeats in toxin)
SAXS	small-angle X-ray scattering
SDS	dodecylsulfát sodný
SPM	self-processing module
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)
v/v	poměr objemů dvou látek v roztoku
wt	wild type (divoký typ)
w/v	koncentrace látky v rozpouštědle (kg/l)
w/w	poměr hmotností látek v roztoku nebo suspenzi

1 Úvod

Bakterie *Neisseria meningitidis* je lidský komenzální mikroorganismus, který při určitých situacích dysbalance vztahu s hostitelem může způsobit i hostitelovo úmrtí. Není tedy divu, že FrpC protein produkovaný touto bakterií, který nese tzv. RTX (Repeat-in-ToXin) doménu charakteristickou pro toxiny rodiny bakteriálních patogenů, vzbuzuje zájem a snahy o odhalení jeho funkce a jeho potenciální role v patogenezi neisseriové meningitidy a sepse. Enzymatická aktivita FrpC proteinu byla popsána jako autokatalytický sestřih s následným kovalentním propojením štěpných produktů tohoto proteinu, která je závislá na navázání vápenatých iontů (Ca^{2+}) do struktury FrpC proteinu. Další výzkum však neprokázal vliv tohoto proteinu v žádné fázi infekce, ačkoliv protilátky proti FrpC proteinu lze najít v séru pacientů s neisseriovou meningitidou. Protože je tento protein sbalován a štěpen při koncentracích Ca^{2+} běžně se vyskytujících jako kontaminace v pufru a také proto, že obsahuje nestrukturovanou smyčku, snahy o charakterizaci struktury FrpC pomocí krystalografie nebo NMR se ukázaly nebýt snadným a přímočarým řešením.

V této práci byl pro popis vazby Ca^{2+} iontu, dynamiky sbalování a strukturních detailů proteinu FrpC použit 177 aminokyselin dlouhý konstrukt nazvaný SPM (self-processing module, samoštěpící modul, FrpC₄₁₅₋₅₉₁), který je nositelem samoštěpící aktivity FrpC. K charakterizaci byly využívány metody fluorescenční spektroskopie, ustálené i časově rozlišené fluorescence, a také terbium (Tb^{3+}), které se ukázalo být, jako trojmocný kovový iont, ideálním luminiscenčním vazebným analogem iontu Ca^{2+} pro vazbu do SPM. Terbium umožnilo zjištění parametrů vazby iontu do proteinu SPM, protože po navázání se zvyšuje jeho fosforescence díky odstranění zhášecího vlivu molekul vody. Také byl popsán rezonanční energetický přenos (Förster resonance energy transfer, FRET) z indolů tryptofanových reziduí SPM (Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉) na navázané Tb^{3+} , čímž byla prokázána jejich blízkost k vazebnému místu pro iont. Pro rozlišení vlivu těchto dvou unikátních tryptofanů v rámci SPM byly charakterizovány, spolu s divokým typem SPM (wt SPM, „wild-type“), také obě varianty SPM s jedním tryptofanem, SPM-W451F a SPM-W519F, u nichž byl tryptofan zaměněn za fenylalanin.

V této práci je popsáno SPM ze dvou úhlů pohledu – z pohledu fluorescence tryptofanu a fosforescence Tb^{3+} . Byla popsána vazba kovového iontu do SPM a její charakter, také důsledky vazby iontu na strukturu SPM, tedy jeho sbalování. Bylo

potvrzeno, že Tb^{3+} může sloužit pro FrpC protein jako vazebný analog Ca^{2+} , v důsledku vazby Tb^{3+} také dochází k sbalení proteinu a je navozena samoštěpící aktivita. Pomocí Tb^{3+} a jeho fosforescence byla také popsána vlastnost vazby iontu, disociační konstanta vazebných míst u SPM a také podobnost sbalování SPM po vazbě Tb^{3+} a Ca^{2+} . Nakonec byly také nastíněny strukturní podrobnosti vazebného místa pro iont a jeho blízkost s oběma tryptofanovými rezidui SPM.

Vhled do elektrostatických interakcí, které umožňují jak vazbu iontů do proteinů, tak i sbalování proteinu a udržení terciární struktury byl dále rozvinut při teoretických úvahách o typické konfiguraci reziduí indolyly v proteinech, jejichž struktura byla vyřešena pomocí rentgenové krystalografie. Zevrubná analýza databáze proteinových struktur (protein data bank, www.wwpdb.org) a publikovaných prací, které se zajímají o význam π - π interakcí mezi aromatickými rezidui tak dala základnu pro popis běžně se vyskytujících konfigurací proteinech, úvahy o vlivu tohoto typu elektrostatické interakce i četnosti výskytu v přírodě.

Zajímavým zjištěním také bylo, jaké množství impaktovaných publikací se neúspěšně utkalo s představou trojrozměrného prostoru v kartézském souřadnicovém systému, kdy běžně převládá jeden významný předsudek. Obecně vžitá mylná představa je, že u velkého množství náhodně uspořádaných molekul budeme nacházet hodnoty úhlů, které svírají osy těchto molekul, se zcela rovnoměrnou pravděpodobností. Tedy, že molekuly budou se stejnou četností nacházeny pod různými vzájemnými úhly. Přitom právě naopak, u náhodně orientovaného souboru molekul budeme vždy nacházet jejich libovolně vybrané osy nejčastěji pod úhlem 90° .

2 Literární přehled

Vápník je biogenní prvek náležící do skupiny kovů alkalických zemin (Ca^{2+}), hojně se vyskytuje v tělech živých organismů, ať už ve formě anorganických solí, vázané na makromolekuly, či volně působící jako druhý posel na úrovni buněk. Stejně jako v eukaryotní buňce, i u prokaryot je homeostáza vápníku pečlivě udržována, Ca^{2+} je zahrnut v mnoha buněčných dějích, např. buněčný cyklus a dělení, transport, motilita, chemotaxe, virulence, signální transdukce (Aitio et al., 1999; Chang et al., 1986; Ordal, 1977; Pettersson et al., 1996; Torrecilla et al., 2001; Waditee et al., 2004; Yu and Margolin, 1997). Koncentrace Ca^{2+} je v bakteriální buňce udržována v řádu nanomolů, oproti milimolární koncentraci vně buňky (Dominguez, 2004). Sbalování proteinů je zpravidla spontánní termodynamicky hnáný proces ustanovení nativní konformace, je dáno hydrofobními interakcemi, van der Waalsovými silami, tvorbou vhodných intramolekulárních vodíkových vazeb. Molekula proteinu může být sbalována během syntézy, případně po nasyntetizování, kdy podmínky v okolí proteinu podmíní změnu konformace za pomoci chaperonů, nebo změna nastane po exportu z buňky, jako třeba sbalování RTX proteinů, které nastává po exportu transportním systémem T1SS právě díky 2 mM extracelulární koncentraci Ca^{2+} (Bumba et al., 2016).

2.1 Proteinové struktury vázající Ca^{2+}

Schopnost proteinů vázat Ca^{2+} a měnit svou konformaci po navázání Ca^{2+} umožňuje zprostředkovávat signální transdukci. Ca^{2+} je specificky vázán v širokých rozmezích disociačních konstant s různou afinitou (v rozmezí 10^{-7} - 10^{-5}) pro specifickou vazbu v různých prostředích různých kompartmentů. Ca^{2+} bývá vázán kyslíkem karboxylové skupiny postranního řetězce Asp a Glu, nebo karbonylové skupiny Asn a Gln (Schwaller, 2001). Iont Ca^{2+} je zde koordinován šesti až osmi ligandy, které patří k různým aminokyselinám v rámci jednoho proteinu, což dovoluje formování vazebného místa v trojrozměrnou strukturu a vynucuje si změnu struktury proteinu.

Proteiny vázající Ca^{2+} se řadí do několika rodin; annexiny, motiv C2 domén proteinů vázajících Ca^{2+} , pentraxiny, proteiny závislé na vitaminu K a „EF-hand“ proteiny (Schwaller, 2001). Domény těchto proteinů, které jsou odpovědné za vazbu

Ca^{2+} , mají různou strukturu, Ca^{2+} iont je zde však zpravidla vázán v blízkosti smyčky, která propojuje konzervované sekundární struktury typické pro každou rodinu; jádro tzv. „annexin fold“ obsahuje 5 α -helixů, které jsou propojeny smyčkou (Schwaller, 2001), C2 domény obsahují antiparalelní β -listy, provázané smyčkami, kde Ca^{2+} je vázán postranními řetězci Asp a karbonylovými skupinami Ser a Thr (Nalefski and Falke, 1996) a asi nejběžnější motiv vázající Ca^{2+} , „EF-hand“ struktury obsahují charakteristický helix-smyčka-helix motiv (Lewit-Bentley and Réty, 2000). Typickým zástupcem proteinů rodiny vázajících Ca^{2+} pomocí struktury „EF-hand“ je eukaryotní calmodulin, navázání Ca^{2+} iontů indukuje změnu struktury následovanou schopností vazby na další enzymy, jejichž aktivitu svou vazbou následně moduluje.

2.1.1 „EF-hand“ proteiny vázající vápník

Motiv „EF-hand“, který váže s vysokou selektivitou kovový iont, se vyskytuje u různých proteinů napříč doménami u eukaryotních organismů, eubakterií i archeí (Kawasaki et al., 1998; Zhou et al., 2006). Poprvé byl popsán na molekule parvalbuminu (Kretsinger and Nockolds, 1973). Kanonický „EF-hand“ motiv je tvořen 29aa, které formují E helix (zpravidla 9aa), smyčku (12aa) a F helix (zpravidla 8aa) (Falke et al., 1994; Kawasaki and Kretsinger, 1994).

Ca^{2+} je vázán ve smyčce „EF-hand“ motivu do struktury pentagonální bipyramidy, v jejímž centru je koordinován Ca^{2+} iont a do ve vrcholech pyramidy jsou ligandy vazebných aminokyselin, kterým je zpravidla kyslík karboxylu nebo karbonylu Asp, Asn, Gln. Vazebné aminokyseliny se nacházejí v rámci smyčky na pozici 1, 3, 5, 7, 9 a 12, přičemž aminokyselina na deváté pozici pouze zprostředkovává koordinaci nepřímo přes vázanou molekulu vody (Kawasaki et al., 1998; Lewit-Bentley and Réty, 2000; Nelson and Chazin, 1998; Ye et al., 2001; Zhou et al., 2006).

Vedle kanonického „EF-hand“ motivu byl popsán i pseudo „EF-hand“, který v smyčce obsahuje 14aa a také „EF-hand like“ motiv, který místo α -helixu může obsahovat jinou sekundární strukturu. Rozdílné může být i uspořádání aminokyselin ve smyčce, která váže iont. „EF-hand“ struktura v proteinech vázajících Ca^{2+} se zpravidla sdružují do dimerů.

2.1.2 Bakteriální RTX proteiny

RTX toxiny (cytotoxiny a cytolyziny, případně proteiny s neznámou funkcí (Lally et al., 1999)) jsou produkovány řadou Gram-negativních patogenních bakterií. Pro RTX proteiny je charakteristická přítomnost RTX domény na C-konci proteinu. Tato doména zpravidla sestává z tandemově uspořádaných opakujících se nonapeptidových repetitivních sekvencí obsahujících Gly a Asp v sekvenčním konsenzu (L/I/F)XGGXG(D/N)DX (X je jakákoliv aminokyselina; (Linhartova et al., 2010; Welch, 1991)). Další typickou charakteristikou RTX proteinů je způsob sekrece pomocí sekrečního systému 1 (T1SS) a sekrečního signálu umístěného na C-koncové části proteinů (Soloaga et al., 1996). Geny kódující sekreční systém přitom bývají součástí genového klastru RTX proteinu v *rtx* lokusu (Omori and Idei, 2003).

RTX doména obsahuje motivy vázající Ca^{2+} ionty. Samotná RTX doména je po nasyntetizování uvnitř bakteriální buňky v rozvolněném stavu, konkrétně u adenylát-cyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertusis* bylo postulováno, že tyto repetitivní motivy vázající Ca^{2+} jsou v nepřítomnosti Ca^{2+} nesbalené, či spíše vnitřně neuspořádané, nevyskytují se v nich žádné sekundární struktury (Chenal et al., 2009). K navázání Ca^{2+} dojde teprve po sekreci proteinu do extracelulárního prostoru, kde je koncentrace Ca^{2+} o několik řádů vyšší oproti koncentraci uvnitř buňky. Navázání Ca^{2+} pak indukuje postupné sbalování RTX domény (Chenal et al., 2009). Jakmile se mimo bakteriální buňku octne první vazebný motiv, Ca^{2+} je navázáno a tím je indukováno další sbalování čerstvě sekretované části proteinu. Sbalování RTX domény pak vyúsťuje ve formování „ β -roll“ struktury (Baumann et al., 1993), které současně napomáhá (Brownovým pohybem) translokaci proteinu sekrečním systémem ven z buňky (Bumba et al., 2016). Významným hnacím motorem celého procesu je také membránový potenciál (negativní náboj uvnitř/pozitivní náboj vně) a negativní náboj nesbalené RTX domény. Protein je tak tažen elektroforetickou hnací silou přes bakteriální membrány sekreční mašinerií T1SS (Bumba et al., 2016).

2.2 Protein FrpC bakterie *Neisseria meningitidis*

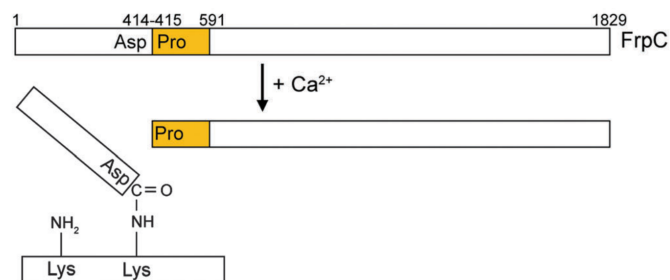
Protein FrpC (železem-regulovaný protein C, z Ferrum-regulated protein C) je produktem bakterie *Neisseria meningitidis*. *Neisseria meningitidis* je Gram-negativní

diplokok, je striktně lidským komenzálním mikroorganizmem, který osidluje nosohltan asi 10 % populace. Je jedním z bakteriálních původců zánětu mozkových plen, ústí mnohdy až do meningokové sepse, ale působení této bakterie v lidském organismu se odehrává jako bezpříznakové nosičství, nebo faryngitida. Protein FrpC je zařazován do rodiny bakteriálních RTX toxinů (**R**epeat-in-**t**oxin), pro které je charakteristická RTX doména obsahující nonapeptidový repetitivní motiv bohatý na glycin a aspartát (L/I/F)XGGXG(D/N)DX (Linhartova et al., 2010; Welch, 1991).

Protein FrpC je tvořen 1829 aminokyselinovými rezidui (molekulová hmotnost je 198 kDa). C-koncová část proteinu FrpC obsahuje sekreční signál, který slouží pro zajištění exportu FrpC z buňky pomocí sekrečního systému typu I (T1SS) (Bumba et al., 2016). Doména RTX je lokalizována mezi rezidui 877 a 1703 a je tvořená 43 nonapeptidovými repeticemi (Thompson et al., 1993). Část na N-konci proteinu FrpC obsahuje enzymaticky aktivní doménu.

Enzymatická aktivita proteinu FrpC je autokatalytické štěpení mezi rezidui Asp₄₁₄ a Pro₄₁₅, které je, stejně jako terciární struktura FrpC, zcela závislá na vazbě Ca²⁺ iontů (Obr. 1). Toto autokatalytické štěpení je následováno zesíťováním nově vytvořených FrpC fragmentů na jiné molekuly a fragmenty FrpC přes isopeptidovou vazbu mezi C-koncovými rezidui Asp₄₁₄ a ϵ -aminovými postranními řetězci rezidui Lys (Osicka et al., 2004). Ačkoliv je schema reakce samoštěpení jasně popsáno (Osicka et al., 2004), přesná biologická úloha tohoto proteinu je stále nerozřešena (Forman et al., 2003; Linhartova et al., 2006). Také úloha jednotlivých aminokyselinových rezidui, které se podílejí na enzymatické aktivitě, tak ve vazbě Ca²⁺, která je podmínkou sbalení proteinu, je stále detailně nepopsána. Ačkoliv je aktivita FrpC charakteru proteázy, primární struktura/sekvence neobsahuje žádný motiv známý u proteinových proteáz. Jediným popsaným motivem, který by mohl naznačit funkci FrpC, je strukturní motiv známý z eukaryotních proteinů vázajících Ca²⁺, tzv. „EF-hand“ (Osicka et al., 2004).

Produkty štěpení FrpC proteinu jsou fragmenty o molekulové hmotnosti 45 kDa (N-konec) a 150 kDa (C-konec). Autokatalytické štěpení FrpC proteinu není možné inhibovat žádným z dostupných inhibitorů proteáz (serinových, aspartátových, cysteinových i metaloproteáz), FrpC protein ani neobsahuje žádný strukturní motiv proteáz, štěpení FrpC proteinu není založeno na mechanismech štěpení proteáz (Osicka et al., 2004).



Obr. 1: Schema autokatalytického štěpení proteinu FrpC, které je zprostředkováno SPM (self-processing module, znázorněn žlutě). Vazba Ca^{2+} iontů umožňuje konformační změnu SPM, která vede ke specifickému štěpení peptidové vazby mezi rezidui Asp₄₁₄-Pro₄₁₅ a následnému kovalentnímu propojení vytvořeného fragmentu (FrpC₁₋₄₁₄) na jinou molekulu proteinu FrpC isopeptidovou vazbou mezi Asp-Lys (Liskova et al., 2016).

Protein FrpC je spolu s proteinem FrpD kódován *frpCD* operonem, tyto proteiny jsou nadprodukovány při podmínkách, kdy *Neisseria meningitidis* hladoví na železo (Basler et al., 2006; Thompson et al., 1993), podmínky limitace železem jsou spouštěcím signálem pro expresi virulenčních faktorů (Grifantini et al., 2003). K tomu zpravidla dochází v rané fázi infekce in vivo (Osicka et al., 2001). Protein FrpD je v periplazmatickém prostoru modifikován na Cys₂₅ lipidem a po této maturaci je FrpD přemístěn na vnější stranu membrány bakterie (Kovacs-Simon et al., 2011). Část proteinu FrpC₁₋₄₁₄ (N-koncový fragment) interaguje s vysokou afinitou ($K_D \sim 0.2$ nM) právě k proteinu FrpD (Prochazkova et al., 2005). In vivo je samoštěpící aktivita a tvorba vyšších molekulárních komplexů FrpC fragmentů indukována po sekreci proteinu z bakteriální buňky, kde se nachází milimolární koncentrace Ca^{2+} . Je tedy možné, že tento komplex FrpD-FrpC₁₋₄₁₄ je exponován na vnější straně buněčné stěny a zprostředkovává tak interakci *Neisseria meningitidis* s povrchem sliznice (Sviridova et al., 2017).

2.2.1 Předpovězená vazebná místa pro Ca^{2+} v proteinu FrpC, mimo RTX doménu – „EF-hand“

V práci (Osicka et al., 2004) podrobili autoři FrpC protein detailní analýze při hledání sekvenčních homologií s jinými proteiny. Snaha najít homologii se strukturním motivem sdíleným proteázami, který by mohl vysvětlit mechanismus autokatalytického štěpení, byla neúspěšná, podobně jako snaha inhibovat autokatalytické štěpení pomocí inhibitorů proteáz. Další oblastí zájmu byla

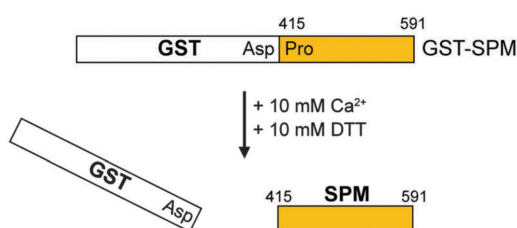
homologie se strukturními motivy odpovědnými za vazbu Ca^{2+} iontů, protože autokatalytické štěpení FrpC je umožněno pouze po vazbě Ca^{2+} . V rámci proteinu FrpC tak byly nalezeny sekvence homologní s motivem „EF-hand“. Jedná se o oblasti s homologií ke kánonickému „EF-hand“ motivu (nalézanému zpravidla u eukaryotních proteinů) minimálně 72 %; FrpC₄₃₉₋₄₅₁ (homologie s „EF-hand“ strukturou 72 %), FrpC₄₆₂₋₄₇₄ (homologie 74 %), FrpC₄₉₉₋₅₁₁ (homologie 91 %), FrpC₅₂₁₋₅₃₃ (homologie 89 %) a FrpC₅₈₅₋₅₉₇ (homologie 75 %) (Osicka et al., 2004). Dvě předpovězená místa vazby Ca^{2+} se nalézají v oblasti SPM. Pomocí mutagenese pak byla identifikována rezidua, která hrají významnou roli buď ve vazbě Ca^{2+} nebo v autokatalytické aktivitě, Asp₄₆₇, Asp₄₉₉, Asp₅₁₀, Asp₅₂₁ a Glu₅₃₂ (Osicka et al., 2004). Všechna zmíněná rezidua se nachází v sekvenci zahrnující SPM.

2.2.2 SPM – Self-processing module

Samo-štěpící modul (SPM, **S**elf-**p**rocessing **m**odule) byl popsán jako nejkratší fragment FrpC (FrpC₄₁₅₋₅₉₁), obsahující 177 aminokyselin, který je samostatně schopen vykonat samoštěpící aktivitu. Uvnitř SPM se také nacházejí dvě z předpovězených motivů vazby Ca^{2+} „EF-hand“, konkrétně mezi rezidui 499-511 a 521-533 v rámci celého proteinu FrpC (Osicka et al., 2004). SPM byl na základě sekvenční homologie také identifikován jako funkční jednotka v několika dalších RTX proteinech produkovaných různými druhy Gram-negativních bakterií (např. *Actinobacillus*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, atd. (Osicka et al., 2004)). Navzdory této skutečnosti však význam SPM pro funkci či aktivitu proteinu FrpC zůstává stále nejasný. Přestože neexistuje (Forman et al., 2003) žádný přímý důkaz toho, že FrpC je zapojen do procesu patogeneze neisseriové meningitidy, sepse, případně má vliv na udržování nosičství, příbuznost s proteinem ApxIVA patogenní bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey et al., 1991) by hovořila pro to, že FrpC by mohl být faktorem virulence. I tak je FrpC vysoce imunogenní a specifické protilátky proti FrpC byly detekovány u většiny případů invazivního meningokokového onemocnění a také u zdravých kontaktů onemocnivších (Osicka et al., 2001). Vzhledem k tomu, že SPM je plně aktivní, měla by také obsahovat všechna místa vazby Ca^{2+} , která umožňují sbalení a enzymatickou aktivitu, těžištěm zájmu o popsání struktury se stalo právě SPM. Vazba Ca^{2+} je stěžejní pro funkci všech RTX

proteinů zejména kvůli sbalování proteinu, které se *in vivo* odehrává v extracelulárním prostoru po sekreci přes vnější membránu T1SS (Bumba et al., 2016) od C-koncové části proteinu, tedy od RTX domény, která obsahuje charakteristické strukturní oblasti vázající Ca^{2+} (Bumba et al., 2016). Pro enzymatickou aktivitu FrpC se však tato oblast ukázala být zbytná. Analýza vazby Ca^{2+} a struktury enzymaticky činné části proteinu FrpC, tedy SPM, může pomoci odhalit funkci FrpC bez ohledu na RTX doménu. Snahy o strukturní charakterizaci SPM pomocí NMR s PRE (Paramagnetic Relaxation Enhancement), tento přístup však vedl pouze k částečnému popisu SPM a ke zjištění, že struktura SPM obsahuje i ve sbaleném stavu nestrukturovanou smyčku v oblasti FrpC₄₂₉₋₄₄₉ (P. Macek, nepublikované výsledky). Tato smyčka patrně znemožňuje krystalizaci SPM a použitá rentgenové krystalografie pro strukturní analýzu SPM. Bližší charakterizace SPM pomocí NMR prokázala, že SPM vykazuje typické vlastnosti tzv. „intrinsically disordered“ proteinů (Kubáň et al., 2015), tedy proteinů s přirozeně rozvolněnou strukturou.

Protein SPM díky své schopnosti samoštěpení také může sloužit jako adaptér pro izolaci proteinů, je-li fúzován s proteinem zájmu a adaptérem, který se váže na matici v chromatografickém průtokovém systému, samoštěpící aktivita zajistí uvolnění proteinu zájmu a jeho purifikaci s přidáním Ca^{2+} (Sadilkova et al., 2008), což může být výhodou oproti podobným systémům využívajícím např. matici s navázaným niklem a imidazolem jako elučním činidlem. Tento mechanismus je také využíván pro izolaci SPM (Obr. 2), pomocí fúzního konstruktů s glutathion-S-transferázou opatřenou C-koncovou značkou obsahující His (tzv. His-tag).



Obr. 2: Schematické znázornění přípravy polypeptidu SPM. Rekombinantní SPM byl exprimován v *E. coli* jako fúze s proteinem glutathion-S-transferáza (GST), autokatalytické štěpení bylo indukováno přidáním 10 mM Ca^{2+} iontů, 10 mM dithiothreitol (DTT) byl přidán, aby bylo zamezeno oxidaci štěpných produktů (Liskova et al., 2016).

2.3 Elektrostatická π - π interakce (Trp-Trp interakce)

Elektrostatická interakce, která působí mezi polarizovanými systémy obsahující π -elektrony, byla popsána jako π - π interakce, nebo také „ π -stacking“ interakce, mezi aromatickými molekulami, kterými jsou i aromatické postranní řetězce aminokyselin. Elektrostatická π - π interakce umožňuje molekulám s touto charakteristikou se uspořádat v konkrétních konfiguracích, která je dána distribucí náboje v interagujících kvadrupolech. Ačkoliv je význam této interakce atraktivní síla uspořádávající tyto planární molekuly, apriorní hnací silou, která toto uspořádání umožní, je přitažlivá síla mezi π -elektrony a σ -elektronovým rámcem molekul, která převládá primárně se odpuzující π - π systémy (Hunter and Sanders, 1990), jejichž teorie popisuje běžnou představu o donor-akceptorovém páru molekul spíše jako zavádějící, neboť by zde měla hrát větší roli vlastnost jednotlivých atomů, nikoliv molekul. Elektrostatická π - π interakce, spolu s K^+ - π interakcí, byla popsána jako jedna ze stabilizujících sil působících na stabilizaci terciární struktury proteinů (Burley and Petsko, 1988). Sdílení π -elektronů je umožněno striktní geometrií, kdy T-konfigurace („T-shaped“) byla výpočetně stanovena jako nejméně odpuzující, zedy preferenční u benzenového dimeru (Sinnokrot et al., 2002), paralelně uložená a navzájem posunutá („parallel-displaced“) konfigurace aromatických molekul by měly být výhodnější než struktura T-konfigurace mezi postranními řetězci v proteinech (McGaughey et al., 1998) a celkově než paralelní uspořádání s oběma molekulami v přesném zákrytu. Vzdálenost mezi dvěma aromatickými postranními řetězci aminokyselin (centroid-centroid separace) byla u proteinových struktur vyřešených pomocí rentgenové krystalografie obvykle vyšší než 4,5 Å a současně by tato vzdálenost neměla překročit 12 Å, aby konfigurace daná π - π interakcí zůstala zachována (McGaughey et al., 1998).

Nekovalentní interakce se také objevuje mezi aromatickými aminokyselinovými rezidui a postranními řetězci jiných aminokyselin, např. Arg, Lys, Asn, Gln, His. Tento jev byl popsán jako amino-aromatická interakce (Burley and Petsko, 1986). Tato K^+ - π interakce se ukázala být také důležitou stabilizující silou v strukturní biologii (Berka et al., 2010; Dougherty, 1996; Gallivan and Dougherty, 1999). Při této interakci např. s indolem mohou být kationy reprezentovány alkalickými kovy nebo i kovy alkalických zemin (De Wall et al., 1999) a mohou napomáhat vazbě iontů do proteinových struktur. Tato interakce také umožňuje

uspořádat a stabilizovat vazbu Ca^{2+} v blízkosti indolylového rezidua v proteinech, jak je popsáno v (Li and Yang, 2005).

Elektrostatická interakce mezi postranními řetězci aminokyselin v proteinech může být předpovězena výpočetními, případně Ab Initio metodami (Sinnokrot et al., 2002), stejně tak může být statisticky hodnocena na základě zpracování velkého souboru dat vyřešených struktur v PDB databázi.

Jsou-li dvě tryptofanová rezidua ve vzájemné blízkosti a konfiguraci vhodné pro vznik π - π interakce, po absorbování světelného kvanta vhodné vlnové délky patrně mohou sdílet excitované π -elektrony, které jsou delokalizované v rámci tohoto interagujícího páru („exciton coupling“). Je možné, že tento stav současně umožňuje rezonanční přenos energie (FRET), v případě sledování systému pomocí fluorescenční spektroskopie, stejně jako ovlivňuje spektrum cirkulárního dichroismu ve vzdálené UV oblasti, jak popsali (Grishina and Woody, 1994; Ohmae et al., 2001).

3 Materiál a metodika

3.1 *Přístrojové vybavení, chemikálie a ostatní materiál*

3.1.1 Přístrojové vybavení

Ultrafiltrační komůrka Amicon 8050, Millipore

Ultrafiltrační membrána, PLGC, velikost póru 10 kDa, Millipore

Digitální váhy ExplorerPro, O'Haus

Filtr 400 nm long-pass (3RD400LP), Omega Optical

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad

Fluorimetr FluoroCube, TCSPC (time correlated single photon counting) IBH 5000 U s chlazeným fotonásobičem/detektorem Hamamatsu R3809U-50 (ÚFCH AVČR, v.v.i.)

Pulzní LED diody (295 nm, Picoquant PLS 300, FWHM 600 ps, 5 MHz frekvence, (ÚFCH AVČR, v.v.i.)

Chladič FT 200, Julabo

Kolona PLRP-S reverzní fáze, Agilent Technologies

Kolona Superdex HR 200 pro gelovou filtraci, GE Healthcare

Křemenná kyveta (objem 50 µl, délka stěny 3 mm), Hellma

Optistat DN cryostat, Oxford Instrument, Abingdon

Mrazicí box (-20 °C), Zanussi

Mrazicí box (-80 °C), Jouan

Odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments

Odstředivka Sorvall RC5C, Du Pont Instruments

pH-metr, Orion 2 Star, Thermo

Polarizační hranol (Glan-Thompson)

Polarizační hranol typ Glan-Thompson

Předvážky Nagma, OWA Labor

Spektrofluorimetr Fluoro Max 3, Horiba Jobin Yvon

Spektrofotometr DU 530, Beckman

Suchý termostatovaný bloček, Major science

Termostatová cirkulační lázeň MB, Julabo

Ultrasonikátor S3000, Misonix

Vortex MS 1, IKA-Works

3.1.2 Seznam použitých chemikálií a ostatního materiálu

Acetonitril, Acetonitril

Akrylamid, Sigma-Aldrich

Bakteriologický agar, Oxoid

Bakto-trytone, Oxoid

Bromfenolová modř, Serva

Chlorid amonný, Lachema

Chlorid sodný, Lachema

Chlorid vápenatý, Lachema

Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva

Dialyzační střevo, 34 mm, 0,025 mm, pór 15 kDa, Roth

Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich

Dithiothreitol (DTT), Serva

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva

Dusičnan terbitý pentahydrát, Sigma-Aldrich

Ethanol, Lachema

Ethylen glykol, Fluka

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva

Glukóza, Lachema

Glycerol pro spektrofotometrii ($\geq 99.5\%$), Sigma-Aldrich

Glycin, Serva

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma-Aldrich

Hydrogenfosforečnan sodný (dodekahydrát), Lachema

Hydroxid sodný, Lachema

Imidazol, Sigma-Aldrich

Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich

Kyselina chlorovodíková, Lachema

Kyselina octová, Lachema

Kanamycin, Sigma-Aldrich

Kvasničný extrakt, Oxoid

Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES), Sigma-Aldrich

Kyselina trihydrogenfosforečná , Lachema
 2-merkaptoethanol, Merck
 Methanol, Lachema
 Močovina, Sigma-Aldrich
 N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Sigma-Aldrich
 N,N'-methylenbisakrylamid, Serva
 Ni-NTA Agarose (Novex®), Invitrogen
 Oregon Green BAPTA-5N, OG-BAPTA, (Invitrogene)
 Persulfát amonný (APS), Serva
 poly-L-Trp (fragmenty 15-50 kDa), Sigma-Aldrich
 Síran hořečnatý, Lachema
 Standardy pro určování hmotnosti proteinů (High Range Molecular Weight Standards): myozin (205 kDa), β -galaktosidáza (116,5 kDa), fosforyláza (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), anhydráza (31 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa), lysozym (14 kDa), Bio-Rad
 Thiamin, Sigma-Aldrich
 Triethylamin, Sigma-Aldrich
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva
 Tryptofan (L-Trp), Sigma-Aldrich

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

3.1.3 Použité roztoky a pufry

Akrylamid, 30% roztok pro SDS-PAGE

Akrylamid.....29 % (w/v)

N,N'-methylenbisakrylamid.....1 % (w/v)

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

Methanol.....225 ml

Voda.....225 ml

Kyselina octová.....50 ml

Coomassie Brilliant blue G250.....0.5 g

Činidlo Bradfordové

Coomassie Brilliant blue R250. 0.01 % (w/v)
Ethanol.....4.7 % (v/v)
H₃PO₄.....8.7 % (v/v)

HEPES pufr

pH 7.4

HEPES.....10 mmol/l
NaCl.....50 mmol/l

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

Methanol.....250 ml
Voda.....650 ml
Kyselina octová.....100 ml

Rozdělovací (resolving) gel pro SDS-PAGE 12.5%

pH 8.8

30% roztok akrylamidu.....2.5 ml
Destilovaná voda.....1.9 ml
1 M Tris-HCl pufr (pH 8,8).....1.5 ml
10% SDS.....50 µl
20% APS.....12.5 µl
TEMED.....12.5 µl

TNE pufr

pH 7.4

Tris-HCl.....50 mmol/l
NaCl.....150 mmol/l
EDTA.....1 mmol/l

Tris-glycinový pufr

pH 8.3

Tris-HCl.....25 mmol/l
Glycin.....250 mmol/l
SDS.....0.1 % (w/v)

TUS pufr pH 8.0

Tris-HCl.....50 mmol/l
Močovina.....8 mol/l
SDS.....1 mmol/l

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE pH 6.8

Tris-HCl.....50 mmol/l
DTT.....100 mmol/l
SDS.....2 % (w/v)
Bromfenolová modř.....0.1 % (w/v)
Glycerol.....10 % (v/v)

Roztok se uchovává zamražený při teplotě -20 °C. Před použitím se přidá 2-merkaptoethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

Zaostřovací (stacking) gel pro SDS-PAGE 4 % pH 6.8

30% roztok akrylamidu.....266 µl
Destilovaná voda.....1.23 ml
1 M Tris-HCl pufr (pH 6,8).....200 µl
10% SDS.....60 µl
20% APS.....20 µl
TEMED.....5 µl

Zásobní roztok solí pro M9 médium (10x koncentrovaný) pH 7.4

Na₂HPO₄.12H₂O420 mmol/l
KH₂PO₄200 mmol/l
NaCl85 mmol/l
NH₄Cl.....93 mmol/l

Sterilizuje se autoklávováním (0.12 MPa, 20 minut).

3.1.4 Použitá kultivační média

Pevné LB medium bylo používáno pro růst bakterií po transformaci plazmidovou DNA. Před sterilizací je do směsi přidáno 20 g/l bakteriologického agaru. Po sterilizaci (121 °C) je médium vychlazeno na teplotu přibližně 50 °C, je přidáno antibiotikum kanamycin ve výsledné koncentraci 60 µg/ml, použito pro přípravu agarových misek, které se uchovávají při 4 °C.

LB médium (Luria-Bertani medium)

Bacto-tryptone.....	10 g
Kvasničný extrakt.....	5 g
NaCl.....	10 g
Deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

pH se upraví na 7,0 pomocí 5 M NaOH. Sterilizuje se autoklávováním (121 °C, 0.12 MPa, 20 minut).

Pro produkci fúzního proteinu GST-SPM v 500 ml třepané kultuře bylo používáno M9 minimální médium s glukózou:

M9 roztok solí (10x).....	100 ml
thiamin	340 mg
glukóza.....	0.4 % (w/v)
1 M MgSO ₄	1 ml
0.1 M CaCl ₂	1 ml
deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

Roztoky glukózy, M9 zásobních solí, MgSO₄ a CaCl₂ jsou sterilizovány autoklávováním, thiamin je sterilizován pomocí 0.22 µm filtru. Jednotlivé přísady jsou přidány sterilně po vychladnutí, kdy také bylo přidáno antibiotikum kanamycin ve výsledné koncentraci 60 µg/ml.

3.1.5 Použité bakteriální kmeny

Pro expresi proteinové fúze GST-SPM byl používán bakteriální kmen *E. coli* BL21(λDE3) (Novagen, USA) *F⁻ ompT gal[dcM] [lon] hsdSB (r_B⁻m_B⁻; an E. coli B strain)* nesoucí DE3, λ profág s genem pro T7 RNA polymerázu. Pro přípravu konstruktu SPM byl použit plazmid *pTYB-FrpCΔ863-1829* (Osicka et al., 2004), ze kterého byl *frpC*₄₁₅₋₅₉₁ orf amplifikován. Pro produkci plazmidu a mutagenezi SPM a

byl používán bakteriální kmen *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA) *recA1 endA1 gyrA96 thi- 1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'**proAB lac1^q ΔM15Tn10(Tet^r)*] (Liskova et al., 2016). Substituce tryptofanu za fenylalanin byla zavedena místně cílenou mutagenézí pomocí „overlap extension“ PCR s dvojicí PCR mutagenních primerů specifických pro obě mutantní varianty SPM, W451F a W519F, podle (Liskova et al., 2016).

3.2 Metody a pracovní postupy

3.2.1 Exprese, izolace a purifikace proteinu SPM

3.2.1.1 Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA

Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21(λDE3) byla provedena teplotním šokem. Před použitím byla bakteriální suspenze uchovávána v LB mediu s glycerolem 20 % (v/v) v -80 °C (kompetentní buňky byly připraveny z kultury ve stacionární fázi růstu). Bakteriální suspenze o objemu 200 µl bylo smícháno s 2 µl plazmidové DNA, směs se inkubovala po dobu 20 minut při 4 °C, poté byla přenesena na 5 minut do 37 °C a následně znovu na 5-10 minut do 4 °C. Po teplotním šoku bylo ke směsi přidán 1 ml předeřátého LB média a kultura byla inkubována 60 minut při 37 °C. Suspenze byla centrifugována na 10000 g po dobu 1 minuty, supernatant byl slit, sedimentované buňky byly resuspendovány ve zbylém mediu a celý objem byl rozetřen na pevné LB médium s antibiotikem kanamycinem (60 µg/ml). Misky byly inkubovány zhruba 14-18 hodin při 37 °C. Krátkodobě byly tyto buňky na agarových miskách skladovány při 4 °C.

3.2.1.2 Produkce proteinu v 500 ml třepané kultuře

Kolonie transformovaných buněk selektovaných na přítomnost plazmidové DNA přidáním antibiotika do media byly použity na zaočkování kultury (50 ml tekutého M9 média s kanamycinem 60 µg/ml). Tato noční kultura byla kultivována za stálého třepání 12-16 hodin při 37 °C. Samotná produkce proteinové fúze GST-SPM probíhala v 500 ml minimálního M9 média s kanamycinem (60 µg/ml), které bylo zaočkováno 5 ml této noční kultury. Bakteriální kultura byla inkubována při teplotě 30 °C za intenzivní aerace třepáním, po dosažení OD_{600nm} = 0.6-0.8 byla indukována exprese proteinového produktu kultivace přidáním IPTG o finální koncentraci 1 mM.

Po indukci produkce proteinu byla kultura inkubována 4 hodiny, poté byla kultivace ukončena ochlazením kultury v ledové lázni. Orientační analýza produkce proteinu na SDS-PAGE může být provedena z kultury 2-3 hodiny po indukci exprese IPTG (1 ml kultury je centrifugován při 10000g 1 minutu, supernatant je odstraněn a buněčný pelet resuspendován v 200 μ l TUS pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 8 M urea, 1 mM SDS), 20 μ l této suspenze je smícháno s 5 μ l vzorkového pufru pro SDS-PAGE).

3.2.1.3 Izolace a purifikace proteinu SPM

Po ukončení kultivace byly buňky *E. coli* BL21(λ DE3) odděleny od kultivačního média pomocí centrifugace (6000g, 20 minut, 4 °C), dvakrát promyty ve 20 ml TNE pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) a resuspendovány v 20 ml TNE pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Buňky byly disintegrovány pomocí sonikace v ledové lázni (4x30 sekund, 60 W, 4 °C), buněčný extrakt byl centrifugován (20000g, 20 minut, 4 °C) a supernatant obsahující proteinový produkt byl bezprostředně nanesen na Ni-Sepharose kolonu (GE Healthcare), která byla předem ekvilibrována TN puforem (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl).

Na koloně obsahující nikelnaté ionty navázané na cukerné matrici (Ni-Sepharose, celkový objem 3 ml) byl proteinový produkt, GST-SPM fúzní protein, selektivně zachycen díky přítomnosti 2x His-tag sekvenci (vazba na matrici Ni-sepharose, GE Healthcare) na N-konci proteinu. Kolona byla promyta 100 ml TN pufru a následně 150 ml TN pufru s imidazolem (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM imidazol). Eluce proteinového produktu byla provedena pomocí TN pufru s imidazolem v koncentraci 500 mM. Eluovaný protein byl jímán v jediné frakci, přítomnost proteinu byla okamžitě sledována pomocí metody Bradfordové (Bradford, 1976) v mikrotitrační destičce jako modré zbarvení činidla (10 μ l frakce smícháno s 90 μ l činidla Bradfordové).

K celému objemu proteinu byl přidán DTT o výsledné koncentraci 10 mM (pro zamezení tvorby izopeptidové vazby mezi Asp-Lys) a CaCl_2 o výsledné koncentraci 10 mM. Vápenaté ionty indukují enzymatickou aktivitu proteinu SPM, který rozštěpí GST-SPM proteinovou fúzi. Vzorek byl 2x dialyzován proti 5000 ml TN pufru (s CaCl_2 2 mM a DTT 10 mM) po dobu 18 hodin v 4 °C, kdy byl jednak odstraněn

imidazol a probíhalo štěpení SPM. Purifikace proteinu SPM byla realizována inkubací vzorku 15 minut v 70 °C, kdy termolabilní GST protein agregoval a byl od solubilního proteinu SPM oddělen následnou centrifugací (5000g, 20 min). Protein SPM byl inkubován s chelatačním činidlem EDTA o koncentraci 15 mM, čímž byly odstraněny Ca^{2+} ionty. Vzorek byl nanesen na kolonu PLRP-S reverzní fáze (Agilent Technologies) ekvilibrovanou pufrům s triethylaminem (50 mM, pH 8.5) a acetonitrilem 5 % (v/v), eluce proteinu proběhla pomocí acetonitrilu 40 % (v/v), protein byl zakoncentrován a zbaven acetonitrilu pomocí rotační vakuové odparky a nanesen na kolonu Superdex HR 200 pro gelovou filtraci (GE Healthcare).

Závěrem byl protein dialyzačně (dialyzační membrána z regenerované celulózy, hraniční molekulová hmotnost 14 kDa, Roth) převeden do HEPES pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl v poměru k objemu vzorku proteinu 5000:1, 12-18 hodin při 4 °C, za stálého míchání), případně zakoncentrován pomocí ultrafiltrační míchané komůrky Amicon (Millipore) s ultrafiltrační membránou (PLGC, velikost póru 10 kDa, Millipore), protein byl skladován při -20 °C.

3.2.1.4 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Koncentrace proteinu SPM byla stanovena metodou podle Bradfordové (Bradford, 1976). Pro standardní kalibrační řadu byl použit bovinní sérový albumin (BSA), ředěný ve stejném pufru jako byl připraven protein SPM, v sérii o koncentracích 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Ke 100 μl vzorku proteinu bylo přidáno 900 μl činidla Bradfordové, vzorky byly promíchány, inkubace trvala 15 minut při laboratorní teplotě 20 °C. Absorbance činidla byla měřena proti referenčnímu standardu (pufr bez proteinu) při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinu byla stanovena podle kalibrační přímky.

3.2.1.5 Syntetický „AFQ“ peptid

V sekvenci FrpC proteinu byla předpovězena vazebná místa pro Ca^{2+} iont podle sekvenční analogie s eukaryotickými strukturami vázajícími Ca^{2+} „EF-hand“ (Osicka et al., 2004). Jedno z těchto předpokládaných míst bylo zvoleno pro in vitro syntézu oligopeptidu (FrpC₅₁₂₋₅₄₀, v rámci SPM zaujímá aminokyseliny 99-128, sekvence viz příloha 6; celkem 29aa, syntetizováno Clonestar). Čistota syntetizovaného peptidu

byla stanovena >96 % pomocí MALDI MS, HPLC (Clonestar peptide service). S tímto 29aa dlouhým peptidem byly provedeny pokusy pro stanovení vazby Tb³⁺.

3.2.2 Kontrola enzymatické aktivity proteinu SPM

Kontrola samoštěpící enzymatické aktivity byla provedena za účelem zjištění funkčnosti mutantních variant proteinu SPM (vždy substituce fenylalaninu za tryptofan na pozicích W451F a W519F) a stanovení koncentračních vztahů mezi proteiny SPM a Ca²⁺ ionty. Proteinový vzorek GST-SPM o objemu 20 µl byl inkubován s roztokem chloridu vápenatého o koncentraci 0-10 mM po dobu 60 minut při teplotě 20 °C. Vznik štěpných produktů byl sledován po rozdělení proteinových fragmentů v 12% gelu pomocí SDS-PAGE.

3.2.2.1 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

K proteinovému vzorku o objemu 20 µl byl přidán vzorkovací pufr (loading buffer) o objemu 5 µl, vzorek byl zahříván na 100 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly nanесeny na gel (zaostřovací gel s akrylamidem 5 % (w/v) a rozdělovací gel 12 % (w/v)). Proces putování v elektrickém poli byl proveden za napětí 8 V/cm² pro zaostřovací gel a 15 V/cm² pro rozdělovací gel v tris-glycinovém pufru. Proteiny byly v gelu obarveny Coomassie Brilliant blue G250 v barvicím roztoku pro SDS-PAGE, gel byl poté odbarven odbarvovacím roztokem pro SDS-PAGE (oboje přibližně 1 hodina, 20 °C, za mírného třepání), promytý destilovanou vodou a vysušen ve folii z regenerované celulózy. Standard proteinů různých molekulových hmotností (High Range Molecular Weight Standards, NEB) byl použit pro stanovení molekulových hmotností vzniklých fragmentů GST a SPM.

3.2.2.2 Denzitometrické stanovení štěpných produktů GST-SPM

Polyakrylamidový gel s proteinovými fragmenty rozdělenými dle velikosti byl oskenován, obrázek ve formátu TIFF byl importován do programu ImageJ (1.50d, <https://imagej.nih.gov/>), kde byl nejdříve rozložen na jednotlivé kanály RGB, dále se v modrém kanálu vybrala oblast gelu s fragmenty o velikosti odpovídající SPM a pomocí nástroje měření ImageJ byla stanovena hustota Coomassie Brilliant Blue G250, kterým byl protein značen. Intenzity zabarvení jednotlivých proužků

odpovídajících štěpným produktům SPM byla srovnávány relativně, bez externí kalibrace na absolutní koncentrace proteinu.

3.2.3 Stanovení vazebných parametrů proteinu SPM pro kovové ionty pomocí Tb³⁺

Přímé spektroskopické stanovení Ca²⁺ iontů navázaných na protein není možné, proto bylo ke stanovení vazebných parametrů SPM pro kovové ionty použito Tb³⁺. Terbium (⁶⁵Tb) je vnitřně přechodný prvek (lanthanoid), který sice za určitých okolností může působit jako těžký kov, které pravděpodobně narušují red-ox homeostázi sulfhydrylových reziduí cysteinu (Gurd and Wilcox, 1956; Sharma et al., 2008), avšak v nižších koncentracích může být použit jako vazebný analog Ca²⁺ iontů. Ačkoliv se Tb³⁺ vyskytuje v trojmocném stavu, na rozdíl od dvojmocného vápenatého iontu, iontové poloměry obou iontů jsou si natolik podobné (Ca²⁺ 1.00 Å, Tb³⁺ 1.18 Å, http://chemglobe.org/ptoe/_/65.php), že Tb³⁺ může v případě vazby do proteinů a jiných látek vázajících Ca²⁺ (kyselina dipikolinová) Ca²⁺ nahradit (Hogue et al., 1992; Lakowicz, 2007; Wallace et al., 1982). Terbium je prvek vykazující fotoluminiscenci (fosforescence), která je navíc zesílena právě po navázání do vazebných míst, kdy je Tb³⁺ ukryto od zhašecího vlivu molekul vody a roste kvantový výtěžek fosforescence (poměr zářivých přechodů-fosforescence vztažený k sumě všech zářivých i nezářivých přechodů-fosforescence, QY, quantum yield). Nárůst intenzity fosforescence při titraci proteinu Tb³⁺ ionty pak odpovídá množství navázaných iontů a je možné ji hodnotit například podle Hillovy rovnice (která popisuje kooperativitu vazby ligandu na receptor (Hill, 1910)). Absorpční i emisní spektrum Tb³⁺ je obrazem energetických přechodů mezi *f* a *d* orbitaly (Guo et al., 2011; Jiao et al., 2013; Tran et al., 2012) obsahuje mnoho maxim na různých vlnových délkách, jejichž intenzita se navíc mění podle stavu, ve kterém se iont nachází. Volné Tb³⁺ je možné excitovat například na vlnové délce přibližně 240 nm, 350 nm, vázané na 260 nm. Pokud se v blízkosti Tb³⁺ navázaného na protein nachází postranní řetězce fluorescenčních aminokyselin (tryptofan, tyrozin), je možné excitovat Tb³⁺ rezonančním energetickým přenosem (Resonance Energy Transfer, RET) na vlnové délce 280 nm, kde tyto aminokyseliny absorbují. Emise Tb³⁺ se odehrává ve velmi úzkých na vlnových délkách v rozsahu 480-700 nm (Horrocks, 1982; Horrocks and Collier, 1981).

3.2.3.1 Měření fosforescenčních emisních a excitačních spekter Tb³⁺ při titraci proteinu SPM Tb(NO₃)₃

Při titraci proteinu SPM dusičnanem terbitým byly ke vzorku proteinu o koncentraci 100 µg/ml (5.3 µM) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) přidávány alikvoty roztoku Tb(NO₃)₃ do maximální koncentrace 500 µM. Za daných podmínek nebyla pozorována precipitace proteinu vlivem přítomnosti Tb³⁺ iontů. Vyšší koncentrace Tb(NO₃)₃ (nad 1 mM) způsobovala rozptyl excitačního paprsku v kyvetě, což naznačuje vznik agregátů proteinu.

Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 µl, délka stěny 3 mm, Hellma) při 10 °C nebo 24 °C. Data intenzit byla nahrávána pomocí spektrofotometru FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, France) se software DataMax (Horiba, Japan). Emisní spektra v rozsahu 520-270 nm byla měřena po excitaci na 240 nm, šíře štěrbin excitačního monochromátoru byla nastavena na 5 nm a emisního monochromátoru na 8 nm. Excitační paprsek procházející emisním monochromátorem kvůli rozptylu druhého řádu byl potlačen pomocí filtru 400 nm long-pass (3RD400LP, Omega Optical), který byl vložen v emisním kanálu. Výsledná spektra byla korigována na intenzitu pozadí (pufr s proteinem) a byla odečtena hodnota intenzity fosforescence na vlnové délce 545 nm. Excitační spektra Tb³⁺ byla nahrávána pro vlnovou délku emise 545 nm v rozsahu vlnových délek 230-400 nm za shodných podmínek nastavení přístroje.

3.2.3.2 Vyhodnocování intenzity emise Tb³⁺ z titračních křivek pomocí Hillovy funkce

Emisní intenzity Tb³⁺ na sledované vlnové délce 545 nm byly vyneseny jako funkce koncentrace Tb³⁺ pomocí programu Fityk 0.9.8 (GNU General Public License, <http://fityk.nieto.pl>, (Wojdyr, 2010)) a byly proloženy Hillovou funkcí, která popisuje vazbu ligandu na receptor v závislosti na kooperativitě vazby:

$$I = \frac{[Tb^{3+}]^n}{K_A^n + [Tb^{3+}]^n} \quad \text{Rov. 1}$$

kde I odpovídá frakci ligandu vázané na receptor, zde daný intenzitou fosforescence Tb³⁺, $[Tb^{3+}]$ je koncentrace ligandu (terbia), $K_A^n = K_D$ disociační konstanta ligandu a n

je Hillův koeficient vypovídající o míře kooperativity vazby ($n \sim 1$ nekooperativní vazba ligandu, $n > 1$ pozitivní kooperativita = jeden navázaný ligand zvyšuje afinitu pro ostatní ligandy, $n < 1$ negativní kooperativita). Pro známé hodnoty koncentrace Tb^{3+} a intenzity fosforescence Tb^{3+} byly nalezeny hodnoty disociační konstanty proteinu SPM pro Tb^{3+} ionty.

3.2.3.3 Odhad počtu navázaných Tb^{3+} iontů na molekulu SPM

Počet Tb^{3+} iontů navázaných na molekulu proteinu SPM byl proveden na základě vynesení hodnot intenzit fosforescence Tb^{3+} změřených při titraci proteinu SPM Tb^{3+} , které byly vyneseny jako funkce poměru koncentrace Tb^{3+} a proteinu SPM (v μM). Křivka byla proložena dvěma přímkami (v oblasti nízké koncentrace a v oblasti saturace), průsečík obou přímek v hodnotě poměru by měl přibližně značit počet iontů vázaných na molekulu SPM (Wallace et al., 1982).

3.2.4 Vytěsnění iontů Tb^{3+} z vazebných míst proteinu kompeticí s Ca^{2+} ionty

Pro ujištění, že se Tb^{3+} ionty váží do stejných vazebných míst v proteinu SPM jako Ca^{2+} ionty, bylo provedeno vytěsnění již navázaných Tb^{3+} iontů titrací $CaCl_2$ (Gross et al., 1987; Hofmann et al., 1988). Kompetice mezi těmito dvěma ionty byla provedena s použitím proteinu SPM o koncentraci 100 $\mu g/ml$ (5 μM) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s $Tb(NO_3)_3$ o koncentraci 200 μM , ke kterému byl postupně přidáván roztok $CaCl_2$ do finální koncentrace 50 mM. Vytěsnění Tb^{3+} iontů bylo sledováno jako úbytek intenzity fosforescence Tb^{3+} (ex. 240 nm, em. 545 nm, šíře štěrbin 6 nm) poté, co se Tb^{3+} po vytěsnění dostalo do kontaktu s molekulami vody, které zhášejí jeho fosforescenci. Celková intenzita fosforescence Tb^{3+} byla vynesena jako funkce koncentrace $CaCl_2$. Pro stanovení frakce Tb^{3+} iontů nevratně navázaných na protein SPM byla použita metodika zhášení fluorescence a jeho model, tzv. modifikovaná Sternova-Volmerova rovnice:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{(f_a \cdot K_a \cdot [Q])} + \frac{1}{f_a} \quad \text{Rov. 2}$$

kde F_0 je původní nezhášená intenzita fluorescence v nepřítomnosti zhášedce, ΔF je rozdíl původní nezhášené intenzity a aktuální intenzity fluorescence ($F_0 - F$) v dané

koncentraci zhasěče $[Q]$, f_a je frakce intenzity/fluoroforu, která je dostupná pro zhasení, K_a je Sternova-Volmerova zhasací konstanta platná pro tuto frakci. V modifikovaném Sternova-Volmerově vynesení je $F_0/\Delta F$ vynesena jako funkce převrácené hodnoty koncentrace zhasěče $1/[Q]$ a výsek funkce na ose y předpovídá chování systému v nekonečně vysoké koncentraci zhasěče ($1/[Q] = 0$) a číselná hodnota znázorňuje f_a^{-1} , tedy frakci molekul fluoroforu dostupných pro zhasení (Lakowicz, 2007).

3.2.5 Stanovení nenavázaného Ca^{2+} při titraci proteinu SPM Ca^{2+} ionty

Oregon Green 488 BAPTA-5N je fluorescenční sonda, která váže Ca^{2+} a na základě vazby Ca^{2+} iontu zvýší intenzitu fluorescence ($K_D \sim 20 \mu\text{M}$, excitační vlnová délka 488 nm, emisní 521 nm). Oregon Green 488 BAPTA-5N (Invitrogene) byla použita pro stanovení takového bodu v titraci SPM Ca^{2+} ionty, kdy jsou všechna vazebná místa pro Ca^{2+} na SPM již satureována a jednotlivé přídavky Ca^{2+} pouze přispívají ke zvyšování koncentrace volného Ca^{2+} v roztoku. Během vazebných pokusů vzniklo podezření, že do vzorků SPM je v průběhu purifikace vnesena kontaminace vyvazující Ca^{2+} , protože rovnovážná titrace Ca^{2+} :SPM (T. Matoušek, nepublikované výsledky) naznačovala, že na jeden protein SPM je vázáno asi 30 iontů Ca^{2+} , což je patrně příliš mnoho pro protein o délce 177aa. Pro měření byly použity dvě koncentrace proteinu SPM (100 $\mu\text{g/ml}$ (5 μM) a 10 $\mu\text{g/ml}$ (0.5 μM)) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s přídavky CaCl_2 až do finální koncentrace 1 mM a Oregon Green 488 BAPTA-5N ve finální koncentraci 1 μM . Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 μl , délka stěny 3 mm, Hellma) při 24 °C. Data intenzit byla nahrávána pomocí spektrofleurometru FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, France) se software DataMax (Horiba, Japan). Emisní spektra v rozsahu 310-500 nm byla měřena po excitaci na 295 nm, šíře štěrbin excitačního i emisního monochromátoru byla nastavena na 8 nm a 6 nm. Výsledná intenzita byla vynesena po odečtení intenzity sondy v nepřítomnosti Ca^{2+} .

3.2.6 Sbalování proteinu SPM po vazbě iontů do vazebných míst

Z hlediska fluorescenční spektroskopie proteinů jsou zajímavé aminokyseliny tryptofan, tyrozin, které absorbují krátkovlnné elektromagnetické záření s maximy

absorpčního spektra ve středněvlnné UV oblasti (278 nm a 274 nm) a emitují fluorescenci v blízké UV oblasti s maximy okolo 354 nm pro Trp a 303 nm pro Tyr (vše měřeno ve vodě/fosfátovém pufru, pH 7.0, (Lakowicz, 2007), <http://omlc.org/>). Kvantový výtěžek fluorescence těchto aminokyselin je nízký, přesto mohou být fluorescenční aminokyseliny použity pro strukturní mapování umístění rezidua v rámci proteinu například pomocí přenosu energie excitovaného stavu aminokyseliny na blízký fluorofor (FRET, Förster resonance energy transfer). Z pohledu sledování proteinové struktury je vhodnou aminokyselinou zejména tryptofan, u kterého je možné pozorovat solvatochromní efekt, tedy vliv polaroty rozpouštědla na vlnovou délku v maximu emisního spektra tryptofanu. Pokud molekula indolu (odpovídající bočnímu řetězci tryptofanu) absorbuje světelné kvantum, dostává se do excitovaného stavu, elektron ve valenční vrstvě je vybuzen do vyššího energetického stavu ($S_0 \rightarrow S_1$) a rozložení náboje na této molekule se změní do doby, než je energie excitovaného elektronu emitována fluorescencí (případně disipována nezářivým přechodem do základního stavu). V prostředí, kde na fluorofor a jeho excitovaný stav nepůsobí elektrostaticky okolní molekuly (vakuum, prostředí nepolárního rozpouštědla), je energie emitované fluorescence nejvyšší možná a tedy emisní vlnová délka maximálně posunutá do modré oblasti. Stokesův posun je v tomto teoretickém případě dán pouze vlastností fluorescenční molekuly. Pokud je molekula indolu obklopena polárním rozpouštědlem, pak změna rozložení náboje na indolu indukuje přeskupení okolních molekul rozpouštědla (Lakowicz, 2007) a také k určité ztrátě energie excitovaného stavu. Následná emise je pak vlivem nižší energie fotonu posunuta do červené oblasti spektra (tzv. „red shift“). Tohoto jevu lze využít při mapování umístění tryptofanu v rámci proteinu; zjišťujeme, zda je tryptofan na povrchu proteinu exponován do vodného prostředí, nebo je sbalen uvnitř proteinu, kde je dostupný menšímu množství molekul vody. Pomocí sledování pozice maxima emisního spektra lze také sledovat sbalování proteinu například v průběhu vazby iontu (pokud to vede ke změně konformace proteinu), jak tomu bylo učiněno v této práci. K vhodnosti využití tryptofanu pro strukturní mapování proteinů napomáhá i fakt, že tryptofan nebývá v proteinech vysoce početně zastoupen (Spies, 1967) mají běžné proteiny průměrný obsah tryptofanu okolo 1-2 %).

Protože wt SPM proteinu obsahuje dva tryptofany, jejichž současná spektroskopická analýza by nebyla možná, byly připraveny dvě mutantní varianty

proteinu SPM, ve kterých byl vždy jeden tryptofan nahrazen téměř nefluorescenčním fenylalaninem. Tyto formy SPM byly charakterizovány spolu s proteinem wt SPM.

3.2.6.1 Absorpční spektra W₄₅₁ a W₅₁₉ v proteinu SPM

Absorpční spektra SPM a mutantních variant SPM W451F a W519F byla měřena v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s CaCl₂ 2 mM. Finální koncentrace proteinu SPM byla vzhledem k nízkému molárnímu extinkčnímu koeficientu tryptofanu okolo 8 mg/ml (zahuštěno po purifikaci proteinu pomocí ultrafiltrační komůrky Centricon, Millipore). Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 μ l, délka stěny 3 mm, Hellma) při 24 °C. Absorpční spektra byla měřena pomocí spektrofotometru (Beckman) v rozsahu 250-320 nm, krok byl zvolen 1 nm a šířka štěrbin byla nastavena automaticky na 1 nm.

3.2.6.2 Měření fluorescenčních emisních spekter Trp a stanovení pozice emisního maxima

Emisní spektra fluorescence ustáleného stavu (steady-state) tryptofanu v proteinu SPM byla měřena kvůli stanovení pozice maxima emisního spektra tryptofanu v průběhu sbalování proteinu při titraci roztoky CaCl₂ a Tb(NO₃)₃. Pro měření byly použity všechny tři varianty proteinu SPM o koncentraci 100 μ g/ml (5.33 μ M) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4). Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 μ l, délka stěny 3 mm, Hellma) při 10 °C nebo 24 °C. Intenzity byly nahrávány pomocí spektrofluorometru FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, France) se software DataMax (Horiba, Japan). Emisní spektra v rozsahu 310-500 nm byla měřena po excitaci na 295 nm, šíře štěrbin excitačního i emisního monochromátoru byla nastavena na 8 nm a 6 nm. Do excitačního kanálu byl vložen polarizační filtr ve vertikální orientaci, do emisního kanálu v orientaci 54.7 ° (tzv. „magický“ úhel, (Lakowicz, 2007)) (intergrální součástí FluoroMax-3). Při použití této geometrie je detekce intenzity nezávislá na anizotropii fluorescence, tedy např. na rotační difúzi fluoroforu. Výsledná spektra byla korigována na intenzitu pozadí (pufr).

Emisní fluorescenční spektra Trp byla hodnocena z hlediska intenzity fluorescence, pozice maxima spektra a poměru intenzit při vlnových délkách 360 nm a 320 nm (FIR360/320nm, fluorescence intensity ratio).

Intenzita fluorescence tryptofanu byla vyhodnocena jako intenzita celého spektra v rozsahu vlnových délek 310-500 nm, tato integrovaná intenzita byla vypočítaná jako suma jednotlivých intenzit fluorescence celého spektra s rozměrem fotony za sekundu (cps, counts per second).

Pozice maxima emisního spektra tryptofanu byla zjišťována pomocí proložení naměřených hodnot funkcí logaritmicko-normálního rozložení (log-normální funkce) v programu Gnuplot 4.2 (<http://www.gnuplot.info>).

Pro popis jednotlivých spekter byla použita funkce v následující podobě:

$$\begin{cases} I(\nu) = I_m \cdot \exp\left\{-\frac{\ln 2}{\ln^2 \rho} \cdot \ln^2\left(\frac{a - \nu}{a - \nu_m}\right)\right\} & (\text{at } \nu < a) \\ I(\nu) = 0 & (\text{at } \nu \geq a) \end{cases} \quad \text{Rov. 3}$$

kde I je intenzita, I_m je maximum/amplituda intenzity, ν_m je pozice maxima v maximu/amplitudě, ν_+ a ν_- jsou pozice obou polovičních maxim, ρ je parametr asymetrie spektra/jednotky: $\rho = (\nu_m - \nu_-)/(\nu_+ - \nu_m)$, a je funkce omezující poziční fluktuaci bodu/maxima: $a = \nu_m + (\rho(\nu_+ - \nu_-))/(\rho^2 - 1)$. Vztah parametrů ν_+ a ν_- k parametru ν_m je popsán:

$$\begin{aligned} \nu_+ &= 0.831 \cdot \nu_m + b_+ \text{ (cm}^{-1}\text{)} \\ \nu_- &= 1.177 \cdot \nu_m - b_- \text{ (cm}^{-1}\text{)} \end{aligned} \quad \text{Rov. 4}$$

kde $b_+ = 7070$ a $b_- = 7780$. Tato funkce (Burstein et al., 2001) popisuje emisní spektrum variant SPM s jedním tryptofanem nepřesně, parametrům b_+ a b_- v bylo umožněno průběhu výpočtu kolísat o $\pm 250 \text{ cm}^{-1}$, aby bylo možné modelovat přesný tvar spektra.

Před proložení spektra log-normální funkcí bylo nutné převést vlnové délky (nm) na vlnočty (cm^{-1}) v rozsahu hodnot ($22000\text{--}32000 \text{ cm}^{-1}$), protože na této škále je vzdálenost konkrétních hodnot vlnočtů lineárně závislá na rozdílu energií fotonů.

Při těchto úpravách spekter nebyla korigována hodnota intenzity fluorescence na proměnnou šířku štěrbin monochromátoru na škále vlnochtů (Toptygin et al., 2001).

Poměr intenzit emise při vlnových délkách 360/320 nm vcelku dobře charakterizuje změny pozice maxima spektra. Toto poměrové vynesení bylo zvoleno pro prezentaci dat v publikaci podle (Chenal et al., 2010).

3.2.6.3 Spektrální dekonvoluce emisních spekter Trp ve wt SPM při titraci proteinu SPM Tb³⁺

Vzhledem k tomu, že wt SPM obsahuje dvě tryptofanová rezidua, výsledné spektrum wt SPM je prostý součet fotonů emitovaných každým tryptofanem pro jednotlivé vlnové délky. Jelikož okolí tryptofanu zásadně ovlivňuje jeho spektrální vlastnosti (dostupnost molekul vody, zhášení postranními skupinami sousedících aminokyselin (Chen and Barkley, 1998)), není možné ze spektrálních dat (intenzita, pozice maxima a tvar spektra) jednoznačně usuzovat o postavení a okolí jednotlivých tryptofanů v rámci celého proteinu. Přibližné rozlišení tvaru a intenzity jednotlivých přispívajících spekter je možné dosáhnout spektrální dekonvolucí. Postup byl obdobný jako při hledání pozice maxima spektra pomocí proložení log-normální funkcí s tím rozdílem, že byla hledaná dvě spektra, jejichž součet měl být co nejvíce shodný s experimentálně naměřeným spektrem. Spektra měla zachovaný svůj tvar, ale poměr jejich intenzit byl předmětem výpočtu. Takové zadání může samozřejmě vyústit ve velké množství různých řešení s různou pravděpodobností, kdy není zřejmé, jakou intenzitou které spektrum přispívá do celkové intenzity. Pro usnadnění výpočtu byly využity známé vlastnosti spekter mutantních forem proteinu SPM nesoucích jeden Trp (W451F a W519F). Prakticky bylo každé takové spektrum proloženo log-normální funkcí, jejíž pozice maxima a tvar levého a pravého ramene (parametry b_+ a b_-) Rov. 3 výše bylo zaznamenáno. Při dekonvoluci spektra SPM byl pro zjednodušení zaveden předpoklad, že se toto spektrum skládá právě ze dvou spektrálních složek, které svým tvarem odpovídají přesně emisním spektrům mutant SPM. Jedinými proměnnými parametry během dekonvoluce pak zůstaly absolutní amplitudy dvou spektrálních komponent. Toto usnadnění je možné použít za předpokladu, že varianty SPM nesoucí pouze jeden Trp se svou terciární strukturou výrazně neliší od wt SPM (tento předpoklad byl potvrzen pomocí 2D NMR-fingerprint metody a SAX, L. Bumba, nepublikované výsledky). Vzhledem k tomu, že pozice a

další charakteristiky tvaru emisních spekter tryptofanu byly použity jako vstupní informací pro výpočet, výsledkem spektrální dekonvoluce byla pouze intenzita fluorescence (integrovaná intenzita) jednotlivých tryptofanových reziduí. Výsledek byl použit pro stanovení míry zhášení fluorescence tryptofanu v případě, že by se Tb^{3+} vázalo do blízkosti tryptofanových reziduí. Předpokládalo se tedy snižování intenzity fluorescence tryptofanu pouze vlivem rezonančního přenosu energie na blízký Tb^{3+} iont. Tento výpočet (proložení funkce spektrem mutantních proteinů a následná dekonvoluce spektra wt SPM) byl proveden opakovaně pro každou použitou koncentraci iontů Tb^{3+} . Dekonvoluce probíhala pomocí scriptů v jazyce Bash, které využívaly program Gnuplot 4.2 (<http://www.gnuplot.info>). Kritériem určujícím úspěšnost dekonvoluce byla změna hodnoty χ^2 .

3.2.7 Časově rozlišená fluorescence Trp v SPM

Doba života excitovaného stavu tryptofanu byla měřena pro stanovení vzdálenosti navázaného Tb^{3+} iontu k indolylu v postranním řetězci tryptofanu. Terbium je vhodný akceptor pro rezonanční přenos energie (FRET) z tryptofanu, díky dobrému spektrálnímu překryvu emisního spektra tryptofanu a excitačního spektra Tb^{3+} . Pokud se Tb^{3+} iont váže do vazebného místa proteinu SPM do blízkosti některého z tryptofanů, bude energie excitovaného stavu tryptofanu přenesena na Tb^{3+} , což se projeví jako zhášení fluorescence tryptofanu. Zhášení tryptofanu Tb^{3+} vede ke zkrácení doby života excitovaného stavu tryptofanu a odpovídá tak modelu dynamického zhášení fluorescence, kdy je emise fluoroforu absorbována tzv. „zhášedčem“ (Lakowicz, 2007). Ze zkrácení doby života excitovaného stavu tryptofanu v SPM s navázaným Tb^{3+} oproti době života tryptofanu v nepřítomnosti Tb^{3+} (SPM s navázaným Ca^{2+}) je možné, pomocí vztahu pro přenos excitační energie mezi emitující molekulou donoru a absorbující molekulou akceptoru (Förster, 1948), určit efektivitu přenosu energie a dále vzdálenost mezi donorem a akceptorem.

3.2.7.1 Měření časově rozlišené fluorescence Trp

Pro měření časově rozlišené fluorescence byl použit systém pro počítání jednotlivých fotonů v čase TCSPC (time correlated single photon counting)

IBH 5000 U s chlazeným fotonásobičem/detektozem Hamamatsu R3809U-50 (microchannel plate photomultiplier detector). Fluorescence byla vybuzena pomocí pulzní LED diody (295 nm, Picoquant PLS 300, FWHM 600 ps, frekvence 5 MHz). V excitační dráze byl vložen polarizační hranol Glan-Thompson s vertikální orientací. Emisní monochromátor byl nastaven na 350 nm s šířkou štěrbin 16 nm, do emisní dráhy byl vložen polarizátor s orientací 54.7 °. V každém měření byly fotony sbírány tak dlouho, dokud kumulativní histogram dob příletu jednotlivých fotonů na detektor ve svém maximu nedosáhl hodnoty 10000 fotonů. Časové měřítko detektoru bylo 8000 kanálů s rozlišením 14.3 ps na kanál. Pro měření byly použity proteiny SPM o koncentraci 100 µg/ml (5.33 µM) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s přidáním Ca²⁺ (CaCl₂) nebo Tb³⁺ (Tb(NO₃)₃) ionty ve finální koncentraci 0.2 mM. Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 µl, délka stěny 3 mm, Hellma) při 10 °C.

Naměřená data byla vyhodnocena pomocí programu DAS5 (IBH), kde byla provedena rekonvoluce dat se signálem excitační diody (instrumental response function, IRF), a pomocí metody nejmenších čtverců, proložena funkcí zahrnující dvě nebo tři komponenty popisující exponenciální dohasínání:

$$I(t) = \sum \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad \text{Rov. 5}$$

kde I je intenzita, τ_i je doba života excitovaného stavu a α_i je amplituda odpovídající preexponenciálnímu faktoru. Pro potřebu výpočtů byla použita relativní amplituda, kterou DAS5 vypočítá podle $B_i = (\alpha_i \cdot \tau_i) / \sum \alpha_j \cdot \tau_j$.

Průměrná doba života excitovaného stavu ($\tau_{ave.}$) použitá pro výpočet efektivity rezonančního přenosu energie byla vypočítaná dle:

$$\tau_{ave.} = (\alpha_1 \cdot \tau_1^2 + \alpha_2 \cdot \tau_2^2) / (\alpha_1 \cdot \tau_1 + \alpha_2 \cdot \tau_2) \quad \text{Rov. 6}$$

3.2.7.2 Stanovení efektivity Försterova rezonančního energetického přenosu (FRET) a výpočet vzdálenosti donor-akceptor

Pro výpočet vzdálenosti mezi donorem energie (Trp) a akceptorem (Tb³⁺) energie byla použita Försterova teorie (Förster, 1948). Schopnost rezonančního přenosu energie v rámci daného páru molekul je popsána parametrem kritická Försterovská vzdálenost (R_0), který vychází z kvantově mechanických výpočtů a obecných vlastností prostředí (index lomu media), vlastností donoru a akceptoru (mohutnost překryvového integrálu spekter, orientační faktor molekul, kvantový výtěžek donoru). Některé z těchto parametrů nemusí reflektovat konkrétní uspořádání fluoroforů ve zkoumané molekule, ale spíše její obecné vlastnosti (faktor relativní orientace tranzičních dipólů bývá zobecňován na průměrnou hodnotu $\kappa^2 = 2/3$). Kritická Försterovská vzdálenost (R_0) vyjadřuje teoretickou vzdálenost, ve které je efektivita energetického přenosu rovna poloviční maximální možné hodnotě $E = 50 \%$ a je popsán rovnicí:

$$R_0 = 9.79 \times 10^3 (J \cdot n^{-4} \cdot \kappa^2 \cdot Q_0)^{1/6} \quad \text{Rov. 7}$$

kde J je překryvový integrál emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru, n je index lomu media, κ^2 je orientační faktor a Q_0 je kvantový výtěžek donoru v nepřítomnosti akceptoru, zde pro výsledek v Ångströmech [Å]. Pro zjednodušení byla hodnota kritické vzdálenosti $R_0 = 4.1$ Å převzatá (Canada and Paltoo, 1998). Vzhledem k nízkým výtěžkům proteinu nebylo možné reprodukovatelně stanovit kvantový výtěžek tryptofanů u všech tří variant SPM a byly proto využity literární údaje. Při výpočtu reálné hodnoty vzdálenosti r mezi donorem a akceptorem se pak vychází z této hodnoty R_0 a z hodnoty efektivity přenosu energie E . Ta může být stanovena experimentálně podle zkrácení doby života excitovaného stavu (případně snížením intenzity fluorescence) donoru v přítomnosti akceptoru τ_{DA} oproti době života (intenzitě fluorescence) donoru o samotě τ_D (Toptygin et al., 2006), kdy energetický přenos působí jako dynamické zhášení, podle vztahu:

$$E = 1 - \left(\frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \right) \quad \text{Rov. 8}$$

kde E je efektivita rezonančního energetického přenosu, τ_{DA} je doba života excitovaného stavu donoru v přítomnosti akceptoru a τ_D je doba života excitovaného stavu donoru v nepřítomnosti akceptoru. Změřené efektivity přenosu energie byly použity k výpočtu reálné vzdálenosti mezi tryptofanem a navázaným Tb^{3+} iontem podle vztahu:

$$r = R_0 \left[\frac{(1-E)}{E} \right]^{1/6} \quad \text{Rov. 9}$$

kde r je vzdálenost v [Å], R_0 je kritická Försterovská vzdálenost a E je efektivita rezonančního přenosu energie.

3.2.8 Anizotropie fluorescence Trp v SPM

Luminiscenční vlastnosti propůjčují molekulám zpravidla konjugované π vazby. Na základě rozmístění π vazeb jsou v molekule směřovány tranziční (excitační a emisní) dipóly. Fluorofor je schopen absorbovat energii pouze takové vlny, jejíž rovina polarizace je s excitačním tranzičním dipólem fluoroforu přibližně paralelní. Díky tomu je umožněn jev fotoselekce, kdy ve směsi fluoroforů s nehomogenně orientovanými excitačními dipóly jsou přednostně excitovány „správně“ orientované molekuly. Tyto molekuly selektované polarizovanou excitací pak v roztoku náhodně rotují a emitují s nenáhodnou polarizací v souladu se svou aktuální orientací a vzhledem k pevně dané geometrii mezi tranzičními dipóly. Následkem fotoselekce a následné rotační difuze molekul se fluorescence šíří nestejněměrně do všech směrů, šíří se anizotropně. Při vhodném experimentálním nastavení je možné stanovit anizotropii fluorescence molekuly fluoroforu, která vypovídá o rychlosti rotační difuze molekuly fluoroforu. Rotační difuze molekuly je dána vlastnostmi molekuly (velikost, tvar) a vlastnostmi prostředí, ve kterém se nachází (viskozita, teplota). Míru rotační difuze fluoroforu, tedy anizotropii fluorescence, lze stanovit při použití vertikálně orientované excitace, kdy intenzita polarizované emise je měřena v orientaci paralelní a kolmé vůči excitaci. Rovnici anizotropie fluorescence lze zapsat:

$$r = (I_{VV} - I_{VH} \cdot G) / (I_{VV} + 2 \cdot I_{VH} \cdot G) \quad \text{Rov. 10}$$

kde r je anizotropie fluorescence, I_{VV} je intenzita polarizované fluorescence paralelní k excitaci, I_{VH} je intenzita fluorescence kolmá k excitaci a G je korekční faktor zohledňující neschopnost detekčního systému měřit intenzitu obou polarizací emise korektně. (G faktor je stanoven experimentálně pro danou vlnovou délku jako $G = I_{HV}/I_{HH}$.)

Změna polarizace emise je daná rozdílem obou intenzit a po normalizaci na totální intenzitu jako na teoretické maximum intenzity (celková intenzita vzorku ve třech směrech polarizace) se pohybuje na škále $< -0.2 ; +0.4 >$ jako anizotropie fluorescence popisující systémy od stavu rigidního (minimální a maximální hodnoty r) k flexibilnímu ($r=0$, tedy v čase emise plně randomizovanému).

Pomocí anizotropie fluorescence mohou být sledovány parametry molekul, které souvisí s jejich pohyblivostí nebo s mikroviskozitou prostředí, lze sledovat průběh sbalování proteinů po přidání látky, jejíž vazba sbalování způsobuje (např. vazba Ca^{2+} iontů do SPM), běžně je takto stanovována teplota fázového přechodu membránových lipidů pomocí hydrofobních fluorescenčních sond.

3.2.8.1 Perrinovo vynesení

Perrinovo vynesení je založeno na změně mobility molekuly v různých prostředích; je měřena fluorescence anizotropie molekuly v prostředí s rozdílnou viskozitou. Rotační difuze molekuly, která má konstantní velikost a v prostředí zaujímá stále stejný prostor, je úměrná viskozitě prostředí. Se zvyšující se viskozitou se bude pohybovat stále pomaleji. V Perrinově vynesení (převrácená hodnota anizotropie fluorescence ($1/r$) v závislosti na viskozitě (T/η) vyjádřené [K/cP] (Kelvin na centiPoiss) (Lakowicz, 2007)) dovoluje výsek na ose Y extrapolovat anizotropii fluorescence v prostředí o maximální teoreticky možné viskozitě, tedy anizotropii fluorescence imobilizované molekuly (teoretickou limitní anizotropii r_0). Tohoto výpočtu se využívá, pokud podmínky úplné imobilizace fluoroforu při praktickém měření není snadné dosáhnout.

V roztoku závisí rotační difuze molekuly, stejně jako anizotropie fluorescence fluoroforu na celkové velikosti molekuly. Teoreticky, pokud je molekula zcela imobilizovaná, rotační difuze je nulová a anizotropie fluorescence r_0 závisí pouze na vlastnosti fluoroforu. V roztoku by anizotropie fluorescence tryptofanu v různých proteinech měla mít různou hodnotu a po zamrazení proteinu by anizotropie

fluorescence tryptofanu měla nabývat pro různé proteiny stejné hodnoty r_0 (Lakowicz, 2007). To neplatí v případě, kdy je fluorescence Trp v různých proteinech různě ovlivněna, např. je doba života excitovaného stavu zkrácena zhášením nebo rezonančním přenosem energie. Perrinovo vynesení bylo v této práci využito jako předběžná metoda, která měla ukázat rezonanční energetický přenos (homoFRET) mezi dvěma Trp ve wt SPM. Mutantní proteiny SPM nesoucí pouze jedno Trp reziduum byly použity jako negativní kontrola, kde nemůže docházet k homoFRETu mezi tryptofany.

3.2.8.2 Časově nerozlišená (steady-state) anizotropie fluorescence

Metoda časově nerozlišené anizotropie fluorescence tryptofanu v SPM byla použita pro kontrolní sledování sbalování proteinu SPM po přidavcích Ca^{2+} iontů a také pro měření rotační difuze sbaleného SPM v prostředích o různé viskozitě pro Perrinovo vynesení.

Pro měření byly použity všechny tři varianty proteinu SPM o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ (5 μM) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s přidanými Ca^{2+} ionty (CaCl_2) ve finální koncentraci 0.2 mM a s přísadkou glycerolu ve výsledné koncentraci 0-50 % (v/v). Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě (objem 50 μl , délka stěny 3 mm, Hellma) při různých teplotách 10-24 $^{\circ}\text{C}$. Teplota byla zajišťována pomocí vodní čerpací lázně (Julabo MB) a ponorným chladičem (Julabo FT 200). Intenzity byla nahrávána pomocí spektrofleurometru FluoroMax-3 (Horiba Jobin Yvon, France) se software DataMax (Horiba, Japan). Emisní spektra v rozsahu 310-500 nm byla měřena po excitaci na 295 nm, šíře štěrbin excitačního i emisního monochromátoru byla nastavena na 8 nm a 16 nm. Do excitačního i emisního kanálu byly vloženy polarizační filtry a byla vypočítaná hodnota anizotropie fluorescence po korekci na pozadí.

3.2.8.3 Časově rozlišená anizotropie fluorescence v -73 $^{\circ}\text{C}$

Časově rozlišená anizotropie tryptofanu v SPM v zamrzlém prostředí způsobujícím imobilizaci proteinů SPM bylo použito pro stanovení úhlu mezi absorpčním a emisním dipólem systému dvou tryptofanů ve wt SPM. U variant SPM s jedním tryptofanem se jednalo o aproximaci limitní anizotropie r_0 . V systému dvou

tryptofanových reziduí ve wt SPM mezi nimiž dochází k rezonančnímu energetickému přenosu, tedy i ke aproximaci dihedrálního úhlu mezi oběma tryptofany.

Pro měření časově rozlišené fluorescence byl použitý systém pro počítání jednotlivých fotonů v čase TCSPC (time correlated single photon counting) IBH 5000 U s chlazeným fotonásobičem/detektozem Hamamatsu R3809U-50. Fluorescence byla vybudena pomocí pulzní LED diody (295 nm, Picoquant PLS 300, FWHM 600 ps, frekvence 5 MHz). V excitační dráze byl vložen polarizační hranol Glan-Thompson s orientací vertikální, emisní monochromátor nastaven na 350 nm (šířka štěrbin 16 nm). V každém měření byly fotony sbírány, dokud kumulativní histogram dob příletu jednotlivých fotonů na detektor ve svém maximu nedosáhl hodnoty 10000 fotonů pro vertikální/vertikální orientaci polarizačních filtrů a 7000 fotonů pro vertikální/horizontální orientaci polarizačních filtrů. Časové měřítko detektoru bylo 8000 kanálů s rozlišením 14.3 ps na kanál. Pro měření byly použity proteiny SPM o koncentraci 100 µg/ml (5 µM) v Hepes pufru (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.4) s přidanými Ca²⁺ ionty (CaCl₂) ve finální koncentraci 0.2 mM a s glycerolem v koncentraci 73 % (v/v). Jako negativní kontrola byl použit vzorek L-Trp. Jako pozitivní kontrola by použit vzorek polypeptidu poly-L-Trp (fragmenty 15-50 kDa, Sigma-Aldrich) připravený rozpuštěním 2.5 mg poly-L-Trp ve 20 µl dimethylsulfoxidu, vzniklá suspenze byla rozpuštěna ve 3 ml ethylen glykolu. Všechna měření byla provedena v křemenné kyvetě bez lepených spojů s délkou optické dráhy 10 mm. Měření probíhala při teplotě -73 °C, která byla udržována pomocí zařízení Optistat DN cryostat (Oxford Instrument, Abingdon, United Kingdom) mechanismem odparu tekutého dusíku z vnitřní kryostatové komory kontrolovaného externím regulátorem teploty. Vzorky byly před měřením ekvilibrovány po dobu alespoň 15 minut. Ve vzorku negativní kontroly byl změřen G faktor. Výsledná časově rozlišená anizotropie fluorescence byla vypočítaná dle Rov. 11 a byla vyhodnocena pomocí programu DAS5 (IBH), kde byla provedena rekonvoluce dat se signálem diody, instrumental response function (IRF), a pomocí metody nejmenších čtverců, proložena funkcí, obdobně jako u časově rozlišeného dohasínání fluorescence:

$$r(t) = (r(0) - r(\infty)) \cdot \exp(-t/\varphi) + r(\infty)$$

Rov. 11

kde $r(0)$ je limitní anizotropie, $r(\infty)$ je reziduální anizotropie (anizotropie dosažená po uplynutí rotačního korelačního času) a Φ je rotační korelační čas sondy.

3.2.8.4 Výpočet úhlu mezi tranzičními dipóly donoru a akceptoru energie při rezonančním přenosu energie

Pro výpočet úhlu mezi absorpčním a emisním tranzičním dipólem dvojice tryptofanů ve wt SPM, mezi kterými dochází k rezonančnímu přenosu energie, byl použit vztah:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad \text{Rov. 12}$$

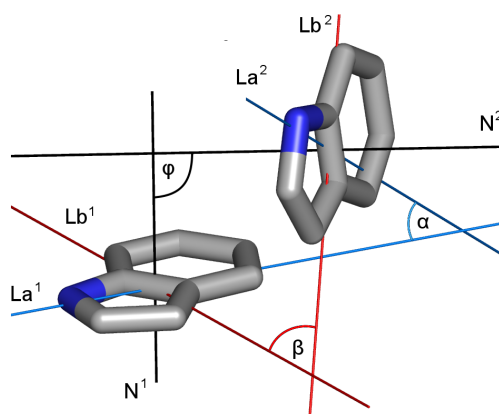
kde r_0 je fundamentální anizotropie fluorescence a β je úhel mezi absorpčním a emisním dipólem systému.

3.3 Analýza konfigurace tryptofanů v proteinech se známou strukturou publikovaných v databázi PDB

Výpočty jednotlivých úhlů jsou součástí mohutného softwaru, který dovoluje filtrovat na různé parametry (počet Trp v proteinu, vzdálenost těžišť mezi tryptofany, atd.) a stanovuje vzájemné vztahy mezi molekulami indolů v rámci struktur z celé PDB databáze a jejich statistické zpracování, který v rámci své diplomové práce vypracovává Bc. Albert Sokol.

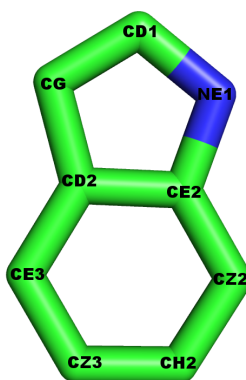
3.3.1 Popis molekuly indolu a její zasazení do souřadnicového systému pro výpočet úhlů

Pro účel výpočtů konfigurací dvou indolů v rámci „pdb“ struktur byl v rámci molekuly indolu stanoven systém souřadnic, který odpovídá tranzičním dipólům tryptofanu (La a Lb) podle (Obr. 3). Zavedení značení odpovídající tranzičním dipólům indolu umožnilo zjednodušení orientace pro představu schopnosti rezonančního přenosu energie, který je např. nedovolený pro kolmou orientaci tranzičního, absorpčního a emisního, dipólu.



Obr. 3: Reprezentativní znázornění os, které byly používány pro výpočet vzájemné orientace tryptofanů; N, normála, La a Lb, korespondují s tranzičními dipóly tryptofanu La a Lb.

Výpočet úhlů, které spolu svírají dva tryptofany v rámci jedné proteinové struktury, probíhal na molekulách uložených v protein data bank, formát „*.pdb“. Jednotlivé vektory (normála a tranziční dipóly) pak byly určeny jako vektor procházející jednotlivými atomy, jak je označeno na Obr. 4. V pdb struktuře má každý atom definovanou pozici v prostoru pomocí koordinát v kartézské soustavě. Normála N určující rovinu kolmou na rovinu indolu byla definována vektorovým součinem dvou vektorů, které byly definovány atomy CZ3-CD1 a CH2-CD1. Pro dva indoly v prostoru, tedy pro jejich dvě normály $N1$ a $N2$, podíl skalárního součinu ($N1$ a $N2$) a velikosti vektorů normál ($|N1|$ a $|N2|$) vyjádřil cosinus úhlu, který spolu svírají. Stejný postup byl použit pro výpočet úhlu, který byl svírán jednotlivými tranzičními dipóly. Tranziční dipóly byly definovány následovně: La protíná atomy NE1-CE3, Lb protíná atomy CH2-CG (Ichiye and Karplus, 1983; Yamamoto and Tanaka, 1972).



Obr. 4: Znázornění indolu a pojmenování jednotlivých atomů indolu podle programu na zobrazování molekul v 3D prostoru Pymol v „pdb“ proteinové struktuře.

4 Výsledky

4.1 Izolace aktivního rekombinantního proteinu SPM

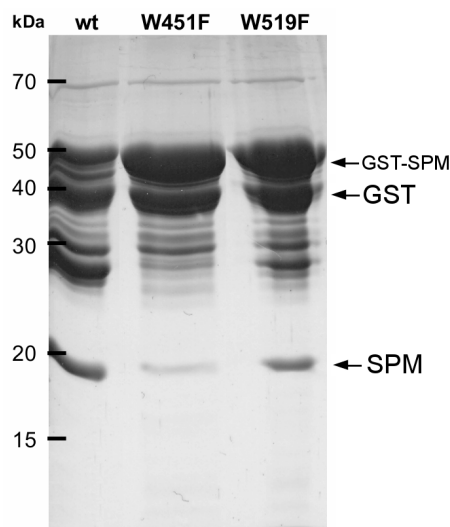
Rekombinantní protein SPM (wt a mutantní proteiny W451F a W519F) byl produkován a izolován ve fúzi s GST. Pro samotnou izolaci SPM je zachování samoštěpící enzymatické aktivity zásadní. Přidání 10 mM CaCl_2 k fúznímu proteinu GSP-SPM byla samoštěpící aktivita SPM indukována a SPM se poté odštěpilo od GST. Izolované proteiny SPM byly tedy pozitivně selektovány svojí funkčností a správným sbalením tuto enzymatickou aktivitu vykonat; pouze správně sbalené proteiny SPM byly odštěpeny od GST a mohly být následně izolovány.

Samostatná kontrola samoštěpící aktivity byla použita také pro stanovení závislosti samoštěpící aktivity na koncentraci Ca^{2+} iontů a SPM. Přidání Tb^{3+} iontů používaných jako luminiscenční alternativa Ca^{2+} iontů k fúznímu proteinu GST-SPM zapříčinilo agregaci proteinů, nikoliv indukci samoštěpící aktivity. Patrně zde došlo k denaturaci GST proteinu, který obsahuje několik cysteinových reziduí (thiolová skupina), se kterými mohou kovalentně reagovat těžké kovy (Gurd and Wilcox, 1956; Sharma et al., 2008), ke kterým je Tb^{3+} možno přiřadit. Enzymatickou aktivitu bylo možné indukovat vazbou Tb^{3+} iontů u delší části proteinu – FrpC Δ RTX, čímž byla potvrzena schopnost Tb^{3+} substituovat Ca^{2+} iont (Lišková, diplomová práce, 2009). Ve všech případech pokusů byly k proteinu SPM, případně k proteinu FrpC přidávány ionty Tb^{3+} do maximální celkové koncentrace 200 μM , byly tedy zachovány podmínky pro udržení proteinů v nativním stavu.

4.1.1 Enzymatická aktivita proteinů SPM

Kontrola samoštěpící aktivity byla prováděna také pro stanovení závislosti této aktivity na koncentraci Ca^{2+} iontů. Schopnost samoštěpení mutantních variant SPM (W451F a W519F) po 60 minutách inkubace s 2 mM CaCl_2 je ve srovnání s wt SPM nižší. Po rozdělení štěpných produktů v polyakrylamidovém gelu je patrný rozdíl mezi množstvími produktů u jednotlivých proteinů (Obr. 5), kdy wt SPM dává nejvyšší podíl produktu (SPM). Není jasné, zda se mutantní SPM svou štěpící aktivitou liší na úrovni enzymové kinetiky (procesivity, rychlosti reakce). Mutantní SPM mohou také mít také pozměněnu afinitu vazebného místa k ligandu, tedy se může lišit potřebná koncentrace ligandu pro vazbu. Dalším důvodem může také být

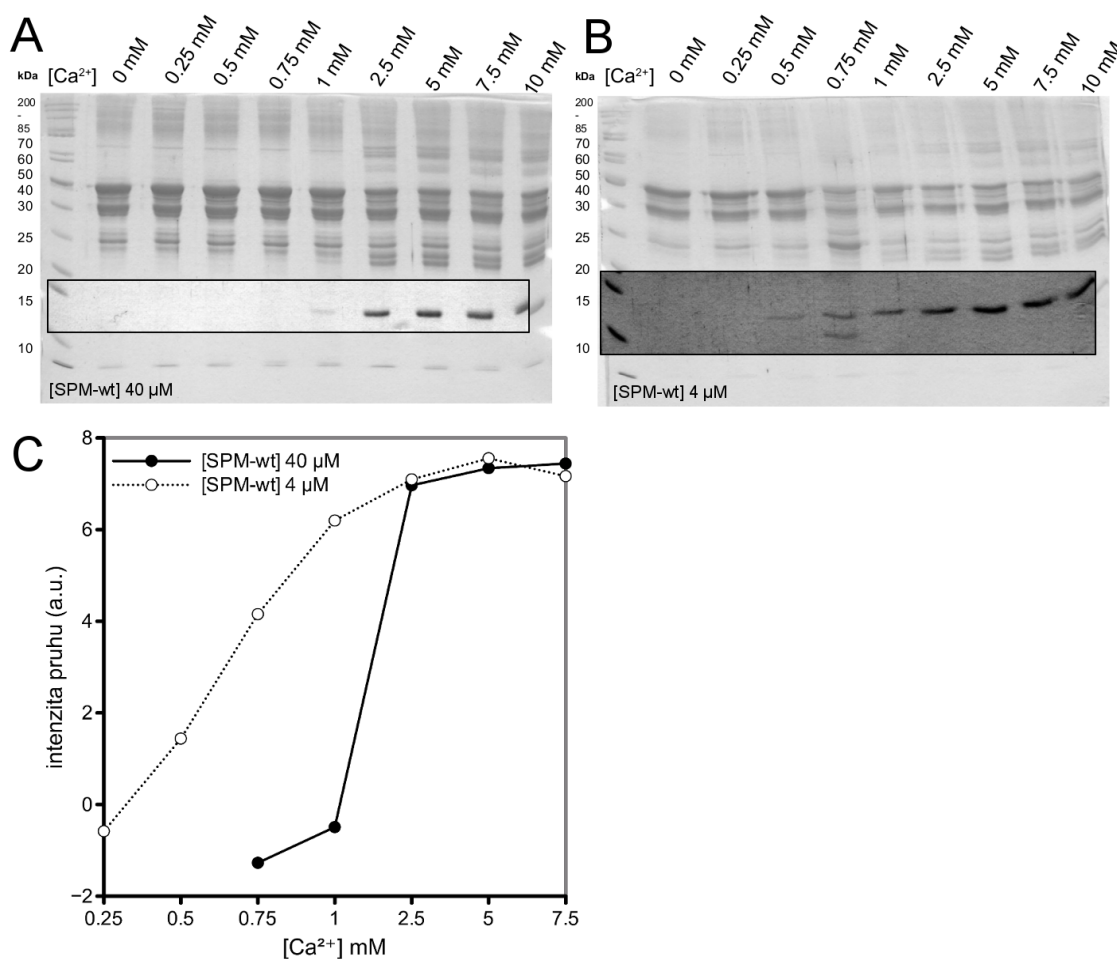
schopnost sbalení se mutantních SPM. Při izolaci proteinů, kdy štěpení probíhalo přes noc, byly výtěžky jednotlivých proteinových variant srovnatelné u wt SPM a W519F, v případě W451F SPM byl výtěžek ve srovnání obou předchozích variant stabilně nižší. Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



Obr. 5: Fúzní protein GST-SPM (10 μ M) byl inkubován s 2 mM Ca^{2+} při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min, naštěpené fragmenty byly separovány v 12% gelu pomocí SDS-PAGE a obarveny Coomassie blue.

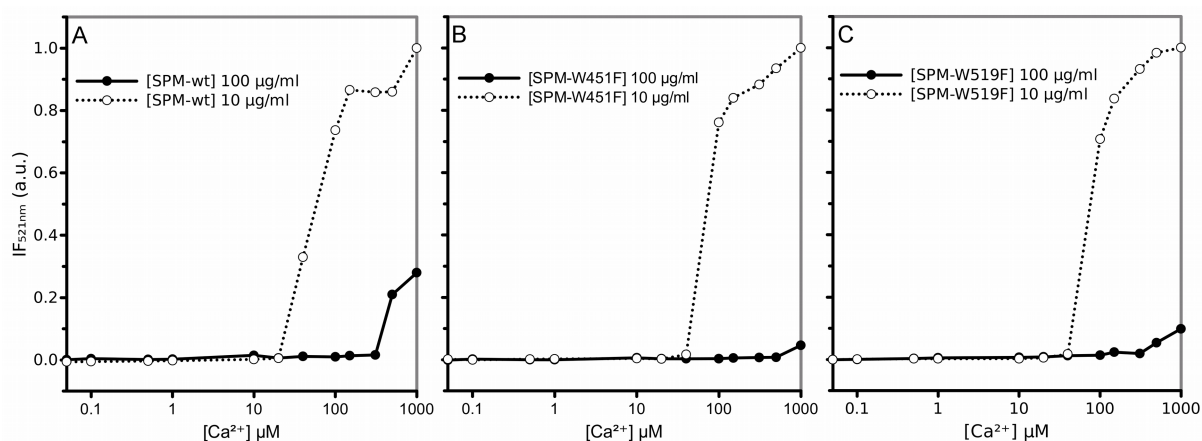
4.1.2 Kontaminace při izolaci proteinu SPM

Za účelem stanovení stechiometrie vazby Ca^{2+} iontů na molekulu SPM byla provedena rovnovážná dialýza s radioaktivním izotopem Ca^{2+} (^{45}Ca). Z výsledků však vyplynulo, že 1 molekula SPM by měla vázat okolo 32 iontů Ca^{2+} (T. Matoušek, nepublikované výsledky). Za účelem stanovení závislosti enzymatické aktivity SPM na koncentraci ligandu byly prováděny také kontroly samoštěpící aktivity fúzního proteinu GST-SPM v různých koncentracích GST-SPM. Z výsledků vyplynula závislost enzymatické aktivity nejen na koncentraci Ca^{2+} , ale právě i na koncentraci proteinu – řádově vyšší koncentrace proteinu vyžadovala pro svou aktivitu řádově vyšší koncentraci ligandu (zde ukázáno na štěpení fúze wt SPM s GST, Obr. 6A-B, vynesení denzitometrického měření na Obr. 6C). O jeden řád vyšší koncentrace GST-SPM kvantitativně vyváže řádově více Ca^{2+} .



Obr. 6: Fúzní proteiny GST-SPM varianty wt SPM o koncentraci (A) 40 μM a (B) 4 μM byly inkubovány s Ca^{2+} o různé koncentraci při 37 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 min. Naštěpené fragmenty alikvot proteinů byly separovány v 12% gelu pomocí SDS-PAGE a obarveny Coomassie blue (na obrázku byl upraven jas a kontrast v oblasti gelu s SPM pro lepší rozlišení). (C) Množství produktu (wt SPM) samoštěpení GST-SPM fúze pro koncentrace 40 μM a 4 μM byl stanoven denzitometricky (ImageJ) a vyneseno do grafu jako funkce koncentrace Ca^{2+} .

Tyto výsledky vedly k hypotéze, že proteinový produkt je v průběhu izolace kontaminován látkou chelatující Ca^{2+} ionty, kterou pravděpodobně bylo chelatační činidlo EDTA. EDTA bylo při i po izolaci proteinu SPM použito pro odstranění Ca^{2+} iontů, aby nedocházelo k předčasnému rozštěpení GST-SPM a aby bylo možno sledovat vazbu Tb^{3+} iontů a proces sbalování proteinu po vazbě iontů. Kontaminace vyvazující Ca^{2+} byla poté potvrzena při titraci proteinových SPM variant Ca^{2+} , kdy byla použita fluorescenční sonda Oregon Green BAPTA-5N (tyto výsledky nejsou součástí první publikace), která váže volný Ca^{2+} v roztoku a tím zvyšuje intenzitu fluorescence (Obr. 7). Při dalších izolacích byl proto do izolačního procesu SPM byl zařazen krok gelové filtrace, při kterém byla chelatační látka odstraněna.



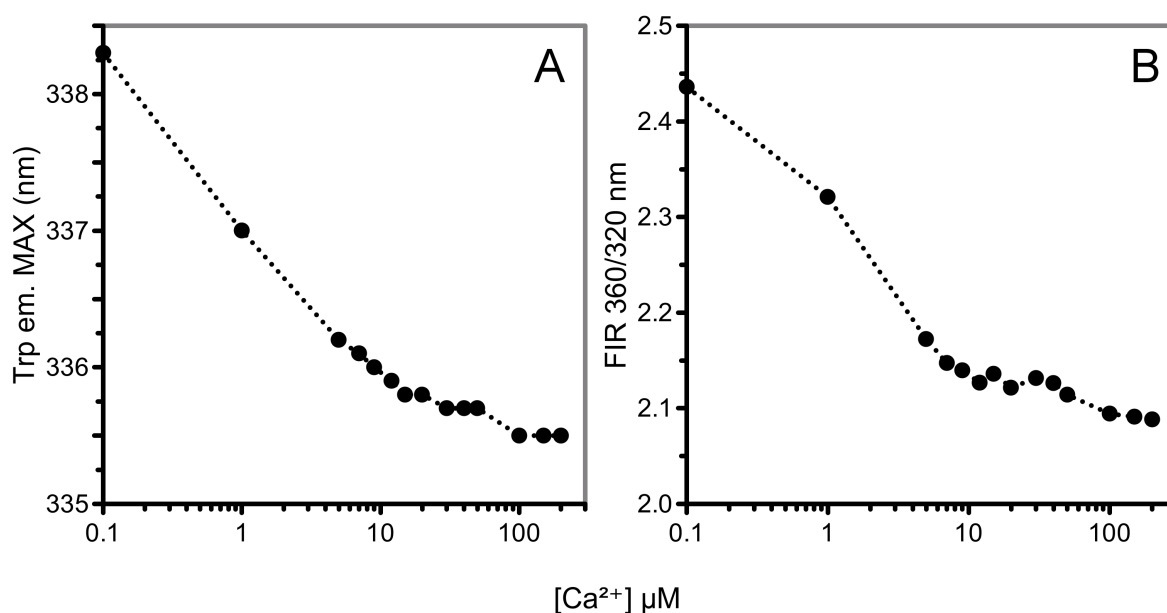
Obr. 7: Intenzita fluorescence sondy Oregon Green 488 BAPTA-5N jako funkce koncentrace Ca^{2+} v přítomnosti proteinů SPM (wt SPM (A), W451F (B) a W519F (C)). Intenzita fluorescence OG-BAPTA indikuje množství volného Ca^{2+} při titraci proteinů SPM o koncentraci 5 μM a 0.5 μM . Grafy ukazují reprezentativní výsledky těchto měření.

4.2 Konformační změny wt SPM po vazbě Ca^{2+} sledované pomocí fluorescence Trp

Biologická aktivita FrpC proteinu, jehož funkční součástí je SPM, byla popsána jako striktně závislá na přítomnosti Ca^{2+} iontů (Osicka et al., 2004). Pro stanovení závislosti terciární struktury proteinu SPM na vazbě Ca^{2+} iontů, byla použita vnitřní tryptofanová fluorescence proteinu, konkrétně pozice emisního maxima tryptofanu. Změna pozice maxima byla sledovaná buď přímo, nebo byla zaznamenána jako poměr intenzit na vlnových délkách v okolí emisního maxima (360 nm a 320 nm, tedy poměr intenzit 360/320 nm) (Chenal et al., 2010). Oba přístupy vykazují podobný výsledek, jak je možné porovnat na Obr. 8B). Pro lepší srozumitelnost bude dále uváděna pouze pozice emisního maxima. Prvotním zájmem bylo charakterizovat tryptofanovou fluorescencí wt SPM, ve kterém jsou přítomny dvě tryptofanová rezidua. Výsledné naměřené spektrum je tedy součtem intenzit v jednotlivých vlnových délkách emise obou tryptofanů, i tak bude posun pozice maxima spektra odrážet sbalování proteinu wt SPM v průběhu titrace Ca^{2+} .

V nesbaleném stavu SPM (HEPES pufr bez přidaného Ca^{2+}) je maximum výsledného emisního spektra tryptofanu v proteinu wt SPM je okolo 339-340 nm (Obr. 8A), indolylové skupiny obou tryptofanových reziduí jsou na povrchu proteinu exponovány do vodného prostředí (Ladokhin, 2000). Při zvyšující se koncentraci

Ca^{2+} , kdy dochází k vazbě Ca^{2+} iontů do proteinu SPM a sbalování SPM, se tryptofanová rezidua SPM začnou přesouvat do hydrofobního prostředí uvnitř proteinu, což se projevuje od koncentrace Ca^{2+} 1-5 μM , kdy se emisní maximum tryptofanů začíná posouvat do modré oblasti. Spektrální posun se zastaví zhruba při koncentraci Ca^{2+} 15 μM na 336 nm, celkový posun činí 3 nm. K finálnímu dobalení proteinu dochází až při koncentraci nad 50 μM . Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



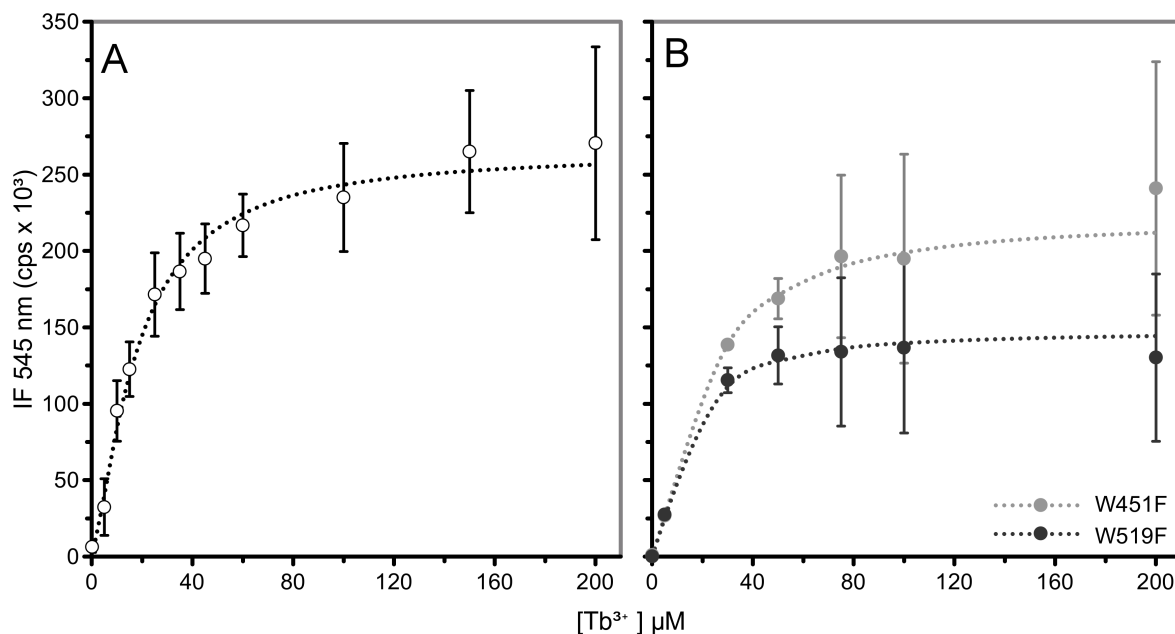
Obr. 8: Pozice emisního maxima tryptofanu (po excitaci při 295 nm) jako funkce koncentrace Ca^{2+} při titraci wt SPM (5 μM) Ca^{2+} vyjádřená na škále (A) vlnových délek (λ (nm)) a (B) jako poměr intenzit fluorescence na vlnových délkách 320 nm a 360 nm (FIR360/320nm). Změna pozice maxima odráží dielektrickou konstantu okolí tryptofanu a přechod tryptofanu do hydrofobního prostředí. Graf ukazuje reprezentativní výsledek titrace.

4.3 Charakterizace vazebných míst proteinů SPM pro ionty

V předchozí kapitole bylo popsáno, že wt SPM mění svou terciární strukturu v souvislosti s vazbou Ca^{2+} iontů. Popis změny struktury proteinu po přidání Ca^{2+} však podává jen nepřímý důkaz o vlastnostech vazby iontu na protein SPM. Vazbu Ca^{2+} iontu do proteinu není možné sledovat přímo z pohledu vázaného iontu, proto bylo pro popis charakteru vazby z pohledu vázaného iontu použito Tb^{3+} , s jehož pomocí byla stanovena disociační konstanta vazebného místa (vazebných míst) pro Tb^{3+} . Pomocí vazebných parametrů pro Tb^{3+} ionty lze vazebné parametry pro vazbu

Ca^{2+} iontu aproximovat. Terbium zvyšuje intenzitu fosforescence po chelataci proteinem, kdy je odstraněn zhášecí vliv molekul vody na ionty Tb^{3+} . Tato jeho vlastnost a také skutečnost, že Tb^{3+} bylo potvrzeno jako vazebný analog Ca^{2+} (Hogue et al., 1992; Horrocks, 1982; Miller et al., 1986; Ohara, 1987; Wallace et al., 1982), umožňuje kvalitativní charakterizaci vazebných míst v proteinu SPM.

V těchto experimentech bylo k proteinu SPM (o koncentraci 0.5-5 μM) přidáváno Tb^{3+} v rozsahu koncentrací 0-200 μM a byla sledována intenzita fosforescence Tb^{3+} na vlnové délce 545 nm. Intenzita pak byla vynesena jako funkce koncentrace Tb^{3+} , výsledná křivka (Obr. 9A-B) byla popsána pomocí Hillový funkce. Jedním z parametrů Hillový funkce je právě disociační konstanta (k_D) vazby ligandu na receptor spolu s Hillovým číslem popisujícím kooperativitu vazby. Hodnoty koncentrace Tb^{3+} nad 200 μM nebyly zahrnuty do analýzy, jednak proto, že tato koncentrace již mohla způsobit agregaci či denaturaci proteinu (data nejsou uvedena), dále také z toho důvodu, že při koncentraci 200 μM se již intenzita neměnila. V případě wt SPM byla stanovena hodnota k_D pro Tb^{3+} okolo 17.5 μM . Pro mutantní proteiny SPM byla stanovena k_D konstanty 20.6 μM pro SPM-W451F a 14.2 μM pro SPM-W519F (Tab. 1). Jediná hodnota k_D popisuje buď jedno vazebné místo (vazebné místo pro jeden iont) nebo skupinu více vazebných míst s podobnými parametry vazby iontu, které se průměrují. Hodnoty Hillova čísla se pohybují okolo 1.5 pro všechny varianty SPM. Tyto výsledky jsou součástí první publikace. Syntetický AFQ peptid reprezentující předpokládané vazebné místo pro Ca^{2+} iont má k_D pro Tb^{3+} okolo 3.5 μM ($n \leq 1$) (součástí publikace v recenzním řízení).



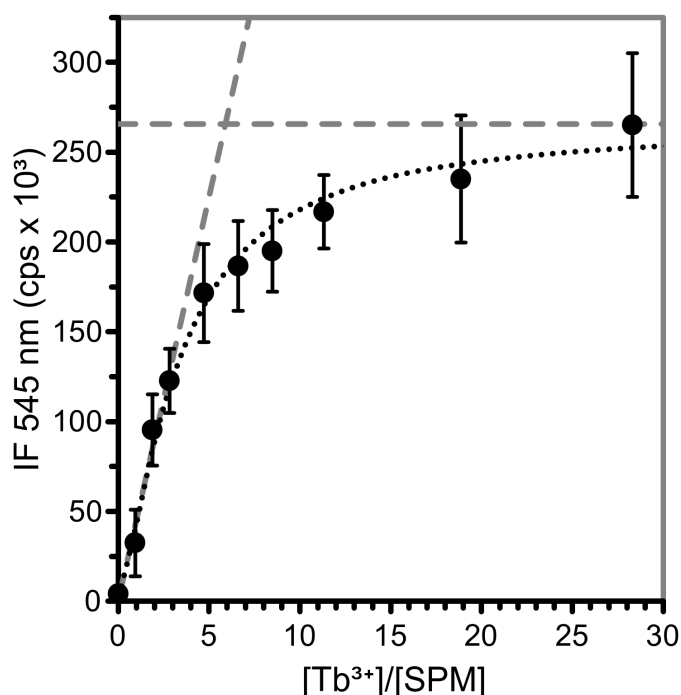
Obr. 9: Rovnovážná titrace proteinů SPM (A) wt SPM a (B) variant SPM s jedním tryptofanem. Intenzita fosforescence Tb^{3+} na 545 nm (při excitaci 240 nm) jako funkce koncentrace Tb^{3+} (průměr aspoň 5 samostatných měření s příslušnými směrodatnými odchylkami). Tečkovaná čára reprezentuje model Hillovy funkce, kterým byla naměřená data proložena (parametry Hillovy funkce jsou v Tab. 1).

	wt	W451F	W519
k_D (μM)	17,5	20,6	14,2
n	1,4	1,4	1,5

Tab. 1: Parametry Hillovy funkce popisující vlastnosti vazby Tb^{3+} na proteiny SPM, kterou byla proložená naměřená data rovnovážné titrace proteinů SPM Tb^{3+} znázorněná na Obr. 4.3.1.

Pomocí tohoto přístupu, z hodnot Hillova čísla a k_D , není možné stanovit přesný počet navázaných iontů, ani vazebných míst. Jakékoliv přiblížení reálné situace znemožňuje také skutečnost, že vazebná místa se mohou lišit v tom, do jaké míry odstraní molekuly vody od iontu Tb^{3+} , tedy jaká bude míra zhášení Tb^{3+} , jeho kvantový výtěžek a reálný příspěvek k celkové intenzitě fosforescence v daném vazebném místě. To platí i v případě koncentrací Tb^{3+} , kde je vazba již v rovnováze a přidavek Tb^{3+} zvyšuje nespecifické pozadí vzorku. Pomocí modifikovaného vynesení dat v grafu na Obr. 10, kdy je intenzita fosforescence Tb^{3+} vynesena jako funkce poměru ligand/receptor, však lze alespoň rámcově odhadnout poměr Tb^{3+} k SPM, kdy dochází k nasycení receptorů ligandem, podle průsečíku lineárních funkcí

proložených v oblasti nárůstu intenzity a v oblasti saturace (přibližně od 30 $[Tb^{3+}]/[SPM]$) (Gross et al., 1987; Hofmann et al., 1988).

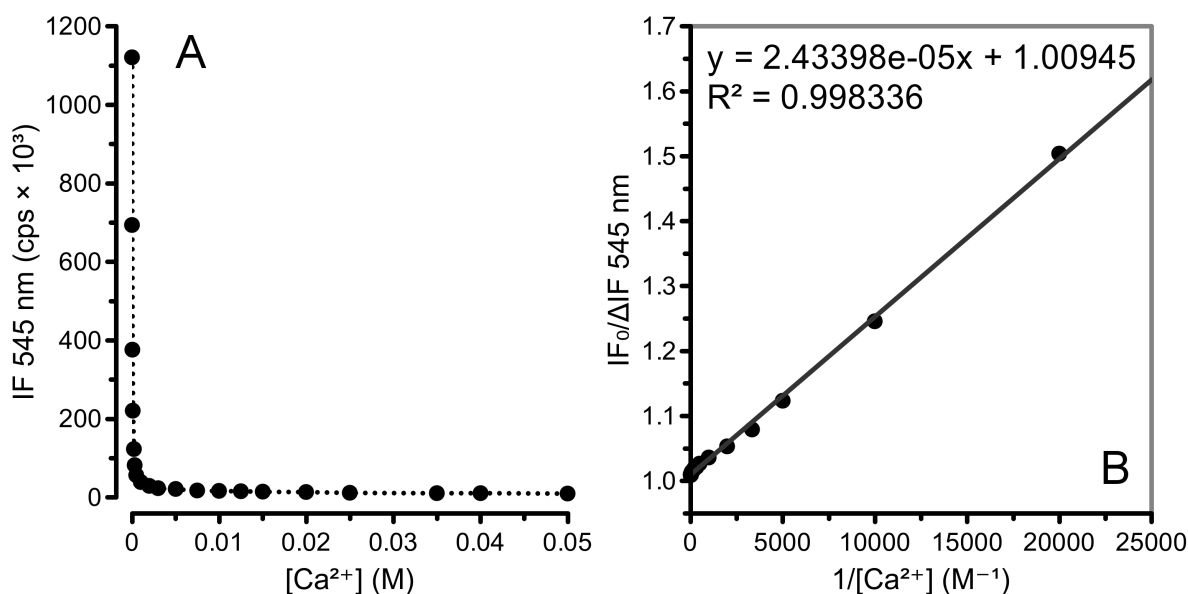


Obr. 10: Rovnovážná titrace proteinu wt SPM. Intenzita fosforescence Tb^{3+} na 545 nm (při excitaci 240 nm) jako funkce poměru koncentrace Tb^{3+} a SPM ($[Tb^{3+}]/[SPM]$) (data z Obr. 9A). Tečkovaná čára reprezentuje model Hillovy funkce, kterým byla naměřená data proložena, teoretické maximum funkce je znázorněno horizontální přerušovanou čarou. Předpokládané množství Tb^{3+} iontů, které se váží na SPM, bylo určeno jako průsečík této konstantní funkce s lineární extrapolací křivky vzrůstu intenzity fosforescence Tb^{3+} (nakloněná přerušovaná čára).

4.4 Ionty Tb^{3+} obsazují stejná vazebná místa jako ionty Ca^{2+}

Pro doložení relevance použití Tb^{3+} namísto Ca^{2+} a také pro potvrzení hypotézy, že ionty Tb^{3+} obsazují stejná vazebná místa v proteinu SPM, která slouží k vazbě Ca^{2+} , byl proveden pokus, při kterém bylo navázané Tb^{3+} z proteinu SPM při titraci nahrazováno Ca^{2+} . Výchozím bodem pro měření intenzity fosforescence Tb^{3+} byl protein SPM v takové koncentraci Tb^{3+} iontů (200 μM), kdy již všechna vazebná místa byla saturována. Postupné přídavky Ca^{2+} iontů po nastolení dynamické rovnováhy umožnily výměnu iontů Tb^{3+} za Ca^{2+} , která byla sledována poklesem intenzity fosforescence Tb^{3+} (Obr. 11A). Data byla vyhodnocena jako zhášení fluorescence (fluorescence quenching). Použité modifikované Sternovo-Volmerovo vynesení obecně dovoluje stanovit frakci fluoroforu, který je

dostupný pro zhášec a která se vypočítá jako reciproká hodnota výseku na ose Y. Z této hodnoty se dá odvodit frakce navázaných Tb^{3+} iontů, které byly následně nahrazeny Ca^{2+} na 99.064 % (Obr. 11B). Tento výsledek naznačuje, že veškeré navázané Tb^{3+} ionty mohou být nahrazeny Ca^{2+} ionty a že tyto navázané Tb^{3+} ionty jsou vázány ve vazebných místech pro Ca^{2+} ionty. Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



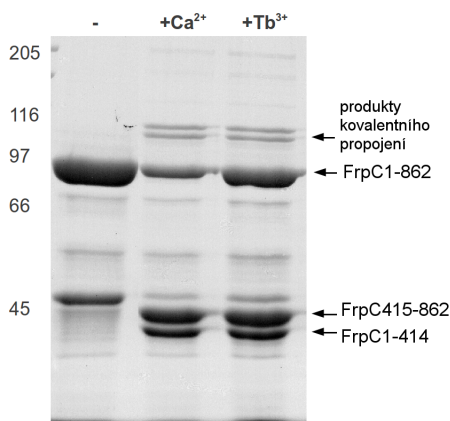
Obr. 11: (A) Snižování intenzity fosforescence Tb^{3+} na 545 nm (při excitaci 240 nm) jako funkce koncentrace Ca^{2+} při nahrazování iontů Tb^{3+} ionty Ca^{2+} ve vazebných místech pro Ca^{2+} ve wt SPM. K wt SPM (5 μM) s navázaným Tb^{3+} (200 μM) byl přidáván Ca^{2+} . Po nahrazení Tb^{3+} vápníkem dochází ke snížení intenzity fosforescence Tb^{3+} vlivem zhášení Tb^{3+} molekulami vody. (B) Modifikované Sternovo-Volmerovo vynesení intenzity fosforescence Tb^{3+} . Lineární regrese určuje výsekem na ose Y ($1/1.01$) frakci Tb^{3+} iontů, která byla dostupná v rámci wt SPM pro nahrazení Ca^{2+} , více než 99 % Tb^{3+} bylo odstraněno z wt SPM ve vysoké koncentraci Ca^{2+} .

4.4.1 Enzymatická aktivita SPM je zachována i po navázání iontů Tb^{3+}

Pokud je Tb^{3+} vhodným analogem Ca^{2+} a současně Tb^{3+} ionty skutečně obsazují stejná vazebná místa v proteinu SPM jako Ca^{2+} ionty, měla by jeho vazba také indukovat autokatalytickou enzymatickou aktivitu FrpC proteinu. Při pokusech o štěpení proteinové fúze GST-SPM (FrpC₄₁₅₋₅₉₁ s N-koncově vázanou glutathione-S-transferázou) po vazbě Tb^{3+} iontů nedocházelo k štěpení GST-SPM, ale k jeho agregaci (nepublikované výsledky). To bylo patrně způsobeno přítomností cysteinu v GST, na jejichž thiolové skupiny mohou být kovalentně vázány právě ionty

těžkých kovů (Gurd and Wilcox, 1956; Sharma et al., 2008), samotný protein SPM žádné cysteinové reziduum neobsahuje.

Schopnost samoštěpení FrpC proteinu po navázání iontů Tb^{3+} byla prokázána u konstruktu FrpC proteinu o 862aa (FrpC s deletovanou RTX doménou, FrpC₁₋₈₆₂), který byl plně schopný samoštěpící aktivity po navázání Tb^{3+} iontů, aniž by došlo k jeho agregaci. Produkty štěpení FrpC₁₋₈₆₂ proteinu indukované v 200 μM $TbCl_3$ byly shodné s produkty štěpení v 2 mM $CaCl_2$ (standardní koncentrace používaná pro kontrolu štěpení FrpC proteinů) (Obr. 12). Lze tedy uzavřít, že použití Tb^{3+} iontů namísto Ca^{2+} je plně v souladu se zachováním terciární struktury a na ní závislé enzymatické aktivity FrpC proteinu Lišková, diplomová práce, 2009 (Liskova et al., 2016). Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



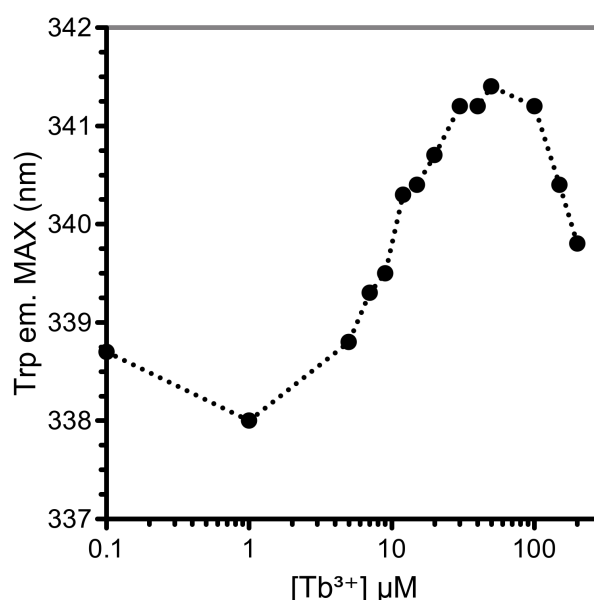
Obr. 12: FrpC₁₋₈₆₂ protein byl inkubován samostatně (-), s $CaCl_2$ 2 mM (+ Ca^{2+}) nebo $TbCl_3$ 200 μM (+ Tb^{3+}) při 37 °C po dobu 30 minut, naštěpené fragmenty byly separovány v 12% gelu pomocí SDS-PAGE a obarveny pomocí Coomassie blue (Liskova et al., 2016).

4.5 Konformační změny wt SPM indukované vazbou iontů Tb^{3+} sledované pomocí fluorescence Trp

Aby byl zkompletována data o vhodnosti používání Tb^{3+} jako analogu Ca^{2+} v případě proteinu SPM, byly sledovány konformační změny indukované vazbou Tb^{3+} , které wt SPM prodělává v průběhu vazby iontu a sbalování do terciární struktury. Změny byly sledovány stanovením pozice maxima emisního spektra tryptofanu, obdobně jako v kapitole 4.2. Ve srovnání s pokusy prováděnými s vazbou Ca^{2+} iontů však SPM vykazuje při vazbě Tb^{3+} iontů rozdílné chování.

Ve wt SPM je postupnou vazbou Tb^{3+} iontů způsoben posun spektra do červené oblasti z původních 339-340 nm přechodně až o 3-4 nm na 341.5 nm při koncentraci Tb^{3+} iontů 50 μM (Obr. 13). Znamená to, že po navázání Tb^{3+} se boční

řetězce obou tryptofanů nepřesouvají do hydrofobní oblasti proteinu, jak je tomu při vazbě Ca^{2+} , ale ještě více se exponují do vodného prostředí. K sbalení proteinu SPM dochází až od koncentrace 50 μM . Dále, při finální koncentraci Tb^{3+} iontů 200 μM se maximum emise vrací až na 340 nm. Je ale důležité si uvědomit, že se jedná o součet spekter dvou tryptofanů ve wt SPM. Protože bylo prokázáno, že tato koncentrace Tb^{3+} není denaturující pro FrpC₁₋₈₆₂ protein, umožňuje jeho enzymatickou aktivitu a nepůsobí agregaci proteinů SPM, není nutné se apriorně domnívat, že je wt SPM vazbou Tb^{3+} iontů denaturováno. Pozorovatelný spektrální posun nemůže být jednoduše vysvětlen bez toho, aniž by byl znám jednotlivý příspěvek obou tryptofanů.



Obr. 13: Pozice emisního maxima tryptofanu (Trp em. MAX (nm), excitace při 295 nm) jako funkce koncentrace Tb^{3+} při titraci wt SPM (5 μM) ionty Tb^{3+} , změna pozice maxima odráží dielektrickou konstantu okolí tryptofanu.

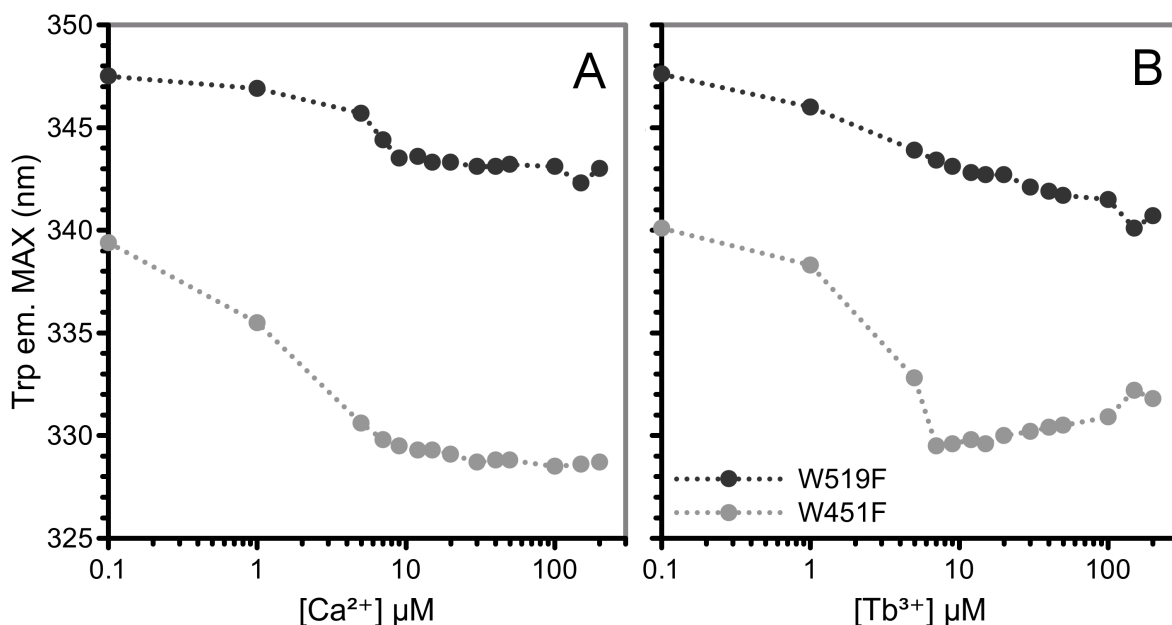
4.6 Konformační změny mutantních SPM, indukované vazbou iontů Ca^{2+} a Tb^{3+} , sledované pomocí fluorescence Trp

V průběhu popisu konformačních změn probíhajících u wt SPM při vazbě Ca^{2+} nebo Tb^{3+} iontů vyvstala potřeba charakterizovat luminiscenční vlastnosti jednotlivých bočních řetězců dvou tryptofanů, které se nacházejí na pozicích Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉ v proteinu SPM. Pro tento účel byly zkonstruovány dvě varianty SPM s jedním tryptofanem, SPM-W519F a SPM-W451F, kde byl tryptofan zaměněn za fenylalanin. U obou těchto mutantních forem proteinu SPM byly měřeny konformační

změny z pohledu pozice maxima emisního spektra každého z tryptofanů při titraci Ca^{2+} i Tb^{3+} ionty, které odpovídalo okolí konkrétního tryptofanu lépe, než by se dalo usuzovat ve wt SPM.

Jak lze sledovat na Obr. 14A-B, v prostředí bez Ca^{2+} nebo Tb^{3+} iontů (HEPES pufr) jsou oba dva tryptofany u variant SPM s jedním tryptofanem (SPM-W451F a SPM-W519F) umístěny na povrchu SPM, jak vyplývá z pozice emisního maxima obou tryptofanů: 339 nm u SPM-W451F a 347 nm u SPM-W519F (nacházejí se ve hydrofilním prostředí, jsou tedy víceméně exponovány do vodného prostředí (Ladokhin, 2000). Toto zjištění plně potvrzuje předpoklad předešlého zjištění (Kubáň et al., 2015; Osicka et al., 2004), že bez navázaného Ca^{2+} jsou proteiny SPM v rozbaleném stavu. Po zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů se emisní maximum posouvá do modré oblasti, tedy tryptofanová rezidua se přesouvají do hydrofobního prostředí uvnitř proteinu. Posun emisního maxima začíná u koncentrace Ca^{2+} 1-5 μM . V případě SPM-W451F se posun maxima zastaví při koncentraci Ca^{2+} 30 μM na vlnové délce 329 nm (celkový posun emisního maxima tryptofanu z rozbaleného stavu do zabaleného je 10 nm). V případě SPM-W519F se posun emisního maxima zastaví při koncentraci Ca^{2+} 15 μM na vlnové délce 343 nm (celkový posun jsou 4 nm). Předpokládáme, že zhruba při koncentraci Ca^{2+} 15-30 μM jsou tryptofanová rezidua každého z mutantních SPM již na své finální pozici ve sbaleném proteinu SPM.

Jsou-li tyto experimenty provedeny ekvivalentně s použitím Tb^{3+} iontů, změřené posuny emisních spekter jsou u obou variant SPM s jedním tryptofanem srovnatelné s hodnotami získanými při titraci ionty Ca^{2+} (Obr. 14B). U mutantních proteinů SPM nepovažujeme tyto rozdíly v chování emisních maxim mezi ionty Ca^{2+} a Tb^{3+} za významné, oproti rozdílům, které byly zjištěny u wt SPM. Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



Obr. 14: Pozice emisního maxima tryptofanu (Trp em. MAX (nm), excitace při 295 nm) při titraci variant SPM s jedním tryptofanem, W451F a W519F (5 µM), jako funkce koncentrace (A) Ca²⁺ nebo Tb³⁺ (B). Změna pozice maxima odráží dielektrickou konstantu okolí tryptofanu. Reprezentativní výsledek titrace.

4.6.1 Změna intenzity fluorescence Trp v proteinech SPM během sbalování po vazbě Ca²⁺ nebo Tb³⁺

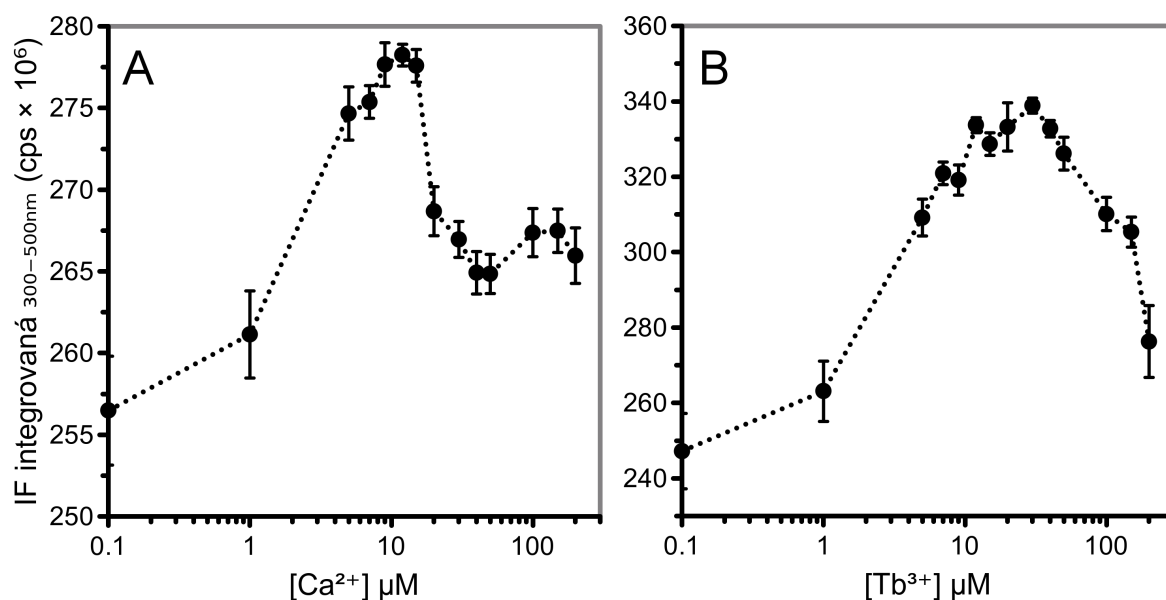
Stejně tak jako poloha emisního maxima tryptofanu, i celková intenzita fluorescence tryptofanu může vypovídat o dielektrické konstantě mikroprostředí obklopujícího tryptofan. Celková intenzita fluorescence tryptofanu, která byla vyjádřena jako součet všech fotonů v emisním spektru (310-500 nm) tryptofanu detekovaných detektorem ve vzorku SPM, se během titrace Ca²⁺ nebo Tb³⁺ ionty výrazně mění (Obr. 15A-B a Obr. 16A-B).

U wt SPM intenzita fluorescence tryptofanu stoupá do finální koncentrace přidanych iontů kolem 10-20 µM. Poté nastává pokles intenzity, který má rozdílný průběh podle použitého iontu (Obr. 15AB). Tyto rozdíly není možné přímo vysvětlit proto, že oba tryptofany v SPM mohou být titrací ovlivněny různě a také proto, že přítomnost postranních řetězců ostatních aminokyselin může způsobovat zhášení fluorescence obou tryptofanů rozdílně, ve srovnání s mutantními variantami SPM, případně může ovlivňovat i podíl nezářivých přechodů tryptofanu.

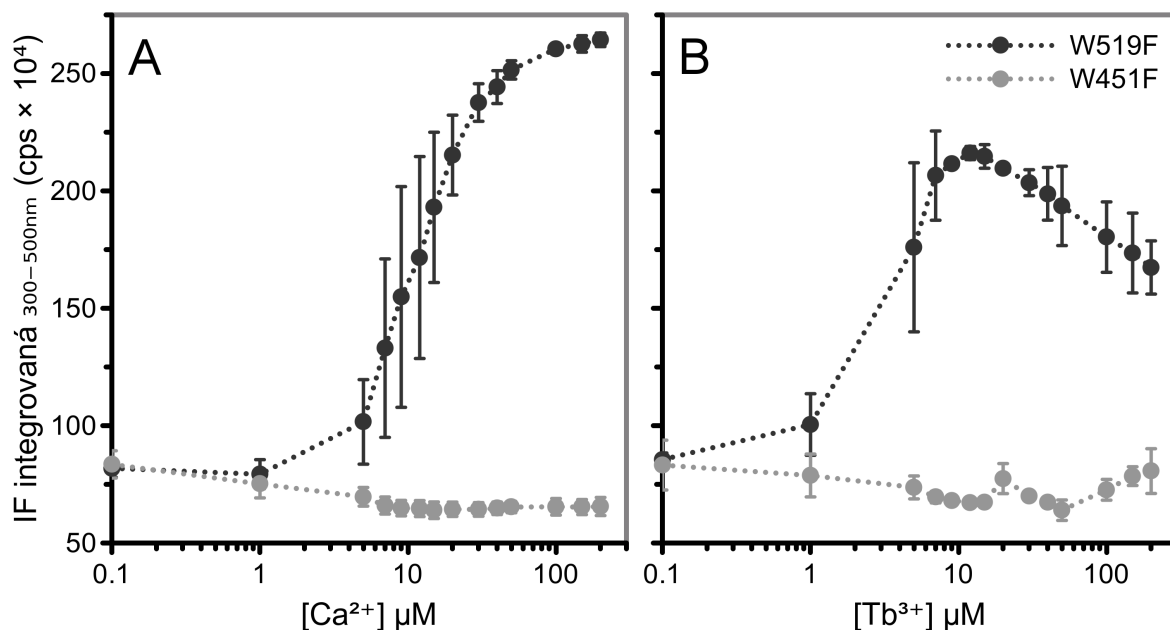
V grafech na Obr. 16A-B je pro srovnání znázorněna intenzita fluorescence Trp obou mutantních forem SPM při titraci Ca²⁺ a Tb³⁺. U SPM-W451F během

titrace intenzita fluorescence tryptofanu v vykazuje mírný pokles srovnatelný pro oba použité ionty. U SPM-W519F s Ca^{2+} se intenzita fluorescence tryptofanu v průběhu konformačních změn vedoucích ke sbalení proteinu plynule zvyšuje, až dospěje do svého maxima a dále se již nemění. V případě mutanty SPM-W519F vázající Tb^{3+} v intenzita fluorescence tryptofanu nejprve stoupá, po dosažení svého maxima u koncentrace Tb^{3+} okolo 15 μM začne klesat. Ve srovnání s maximální hodnotou SPM-W519F dosaženou při titraci Ca^{2+} je intenzita naměřená s Tb^{3+} nižší.

Pro vysvětlení, proč se intenzita fluorescence Trp₄₅₁ (v proteinu SPM-W519F) chová rozdílně při titraci ionty Ca^{2+} a Tb^{3+} , byly navrženy další experimenty. Pravděpodobným důvodem by mohl být rezonanční přenos energie (RET, resonance energy transfer) z Trp₄₅₁ na iont Tb^{3+} . Tento přenos je teoreticky umožněn spektrálním překryvem emisního a absorpčního spektra (donoru představovaného tryptofanem a akceptoru energie představovaného Tb^{3+}) a předpokládá by také vzájemnou blízkost Trp₄₅₁ a iontu Tb^{3+} navázaného do vazebného místa SPM-W519F. Pokud by se prokázala blízkost navázaného iontu Tb^{3+} k tryptofanu, bylo by to také částečně vysvětlení pro rozdílnou povahu emise dvou různých tryptofanů ve wt SPM. Tyto výsledky nejsou součástí první publikace.



Obr. 15: Integrovaná intenzita fluorescence tryptofanu (300-500 nm, excitaci 295 nm) titrace obou wt SPM (5 μM), jako funkce koncentrace (A) Ca^{2+} nebo (B) Tb^{3+} , vyjádřen průměr z počtu stanovení $n > 10$ s příslušnou směrodatnou odchylkou.



Obr. 16: Integrovaná intenzita fluorescence tryptofanu (300-500 nm, excitaci 295 nm) titrace obou mutant SPM obsahujících jeden tryptofan, SPM-W451F a SPM-W519F (5 μ M), jako funkce koncentrace (A) Ca^{2+} nebo (B) Tb^{3+} , vyjádřen průměr z počtu stanovení $n > 10$ s příslušnou směrodatnou odchylkou.

4.7 Určení vzdálenosti mezi tryptofany v SPM a navázaným iontem Tb^{3+} pomocí rezonančního energetického přenosu (FRET)

Pokud je ke stanovení vzdálenosti mezi donorem a akceptorem energie excitovaného stavu fluoroforu použita Försterova teorie (Förster, 1948), stanovení efektivit přenosu energie mezi dvěma molekulami lze provést pomocí měření ustálené fluorescence (změna intenzity donoru) i časově rozlišené (zkrácení doby života excitovaného stavu). Integrovaná intenzita emise donoru však může být způsobena více faktory, např. statickým i dynamickým zhášením, veškerý úbytek intenzity nemusí odrážet proporčně množství přenesené energie, současně je také citlivá na absolutní množství donoru a akceptoru. Časově rozlišené měření lépe vystihuje komplexněji FRET (podobně jako i dynamické zhášení) pomocí zkrácení doby života excitovaného stavu donoru. Interpretace dat časově rozlišené fluorescence je současně také složitější. Proto bylo před samotným časově rozlišeným měřením pro odhad možnosti přenosu energie použito i měření ustálené fluorescence, konkrétně byla nahrávána excitační spektra Tb^{3+} .

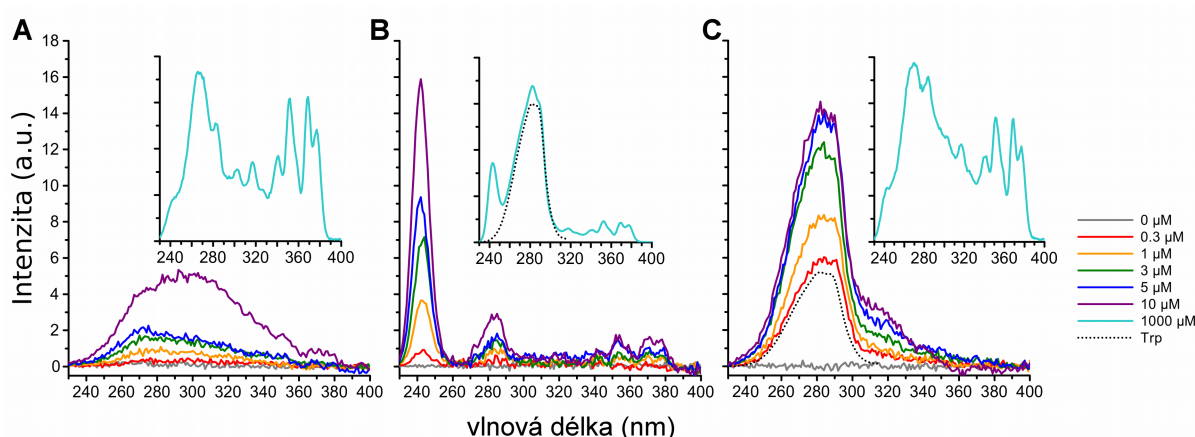
4.7.1 Excitační spektra Tb³⁺ iontů v roztoku a navázaných na protein

Pro předběžný důkaz rezonančního přenosu energie z tryptofanu na Tb³⁺ byla naměřena excitační spektra Tb³⁺ v roztoku (pufr) a Tb³⁺ navázaného na proteiny SPM. V poměrné koncentraci proteinu/Tb³⁺, kdy začíná docházet k vazbě na SPM, se v členitém excitačním spektru Tb³⁺ (excitační maxima odpovídají různým přechodům elektronů ve valenční vrstvě *d* a *f* orbitalů, (Guo et al., 2011; Jiao et al., 2013; Tran et al., 2012), naměřeného pro emisní vlnovou délku 545 nm, začíná objevovat emisní maximum, které odpovídá excitačnímu spektru tryptofanu. Toto excitační maximum je možné sledovat u vzorku Tb³⁺ ve vodě a po navázání do SPM všech variant (nepublikovaná data). Z tohoto výsledku lze odvodit, že u proteinů SPM je možný rezonanční přenos energie z tryptofanu na blízce navázaný Tb³⁺ iont. Tyto výsledky jsou součástí publikace v recenzním řízení, příloha 6.

Špičky excitačního spektra Tb³⁺ jsou lokalizovány na více vlnových délkách. Na Obr. 17 jsou postupně představeny tři stavy Tb³⁺; volné Tb³⁺ v pufru (HEPES), Tb³⁺ vázané na SPM a na 29 aminokyselin dlouhý peptid „AFQ“, který reprezentuje jedno z předpokládaných vazebných míst pro Ca²⁺ v SPM.

Samotné Tb³⁺ v pufru (Obr. 17A) V nízké koncentraci Tb³⁺ (0.3-10 μM) se intenzita zvyšuje v celém měřeném pásmu 240-400 nm, což je možné přisuzovat nespecifické vazbě (komplexům) Tb³⁺ s molekulami pufru (Caldwell, 1989; Ma et al., 1993; Miller et al., 1986). Ve vyšší koncentraci Tb³⁺ (1 mM) vystupují jednotlivá excitační maxima, která odpovídají volnému Tb³⁺, konkrétně na 266 nm, 350 nm a 368 nm. Tb³⁺ v nízké koncentraci (0.3-10 μM) přidané k proteinu SPM vykazuje zejména maximum excitace na 243 nm a současně menší míře také na 284 nm (Obr. 17B), tedy na vlnových délkách, kde se maxima úzkých excitačních špiček volného Tb³⁺ nevyskytují. Ve vyšší koncentraci Tb³⁺ (1 mM) převažuje maximum na 284 nm, tato špička je oproti špičce volného Tb³⁺ také rozšířena, což naznačuje, že ve vyšší koncentraci dochází také k excitaci Tb³⁺ rezonančním přenosem energie (FRET). Na Obr. 17C je Tb³⁺ navázané k syntetickému AFQ peptidu. V nízké koncentraci Tb³⁺ (0.3-10 μM) se objevuje pouze excitační maximum v pásmu 250-300 nm s maximem při 284 nm, které má stejný tvar jako excitační spektrum Trp (černě tečkovaná čára, měřeno pro emisní vlnovou délku 350 nm, emise Trp). To naznačuje, že Tb³⁺ je navázáno v těsné blízkosti Trp519 a je excitováno výlučně rezonančním přenosem energie z přilehlého Trp. Při použití časově rozlišené

fluorescence je tato hypotéza prokázána, neboť po přidání Tb^{3+} k AFQ peptidu dochází ke zkrácení doby života excitovaného stavu z původní hodnoty 3.24 ns na 2.38 ns, dochází tde tedy prokazatelně k dynamickému zhášení a rezonančnímu přenosu energie (s výslednou vzdáleností Trp-Tb^{3+} 4.85 Å pro $R_0=4.1$ Å (Canada and Paltoo, 1998)). V koncentraci Tb^{3+} 1 mM se objevují také excitační maxima, která přináležejí volnému Tb^{3+} v pufru. Tyto výsledky jsou součástí publikace v recenzním řízení.



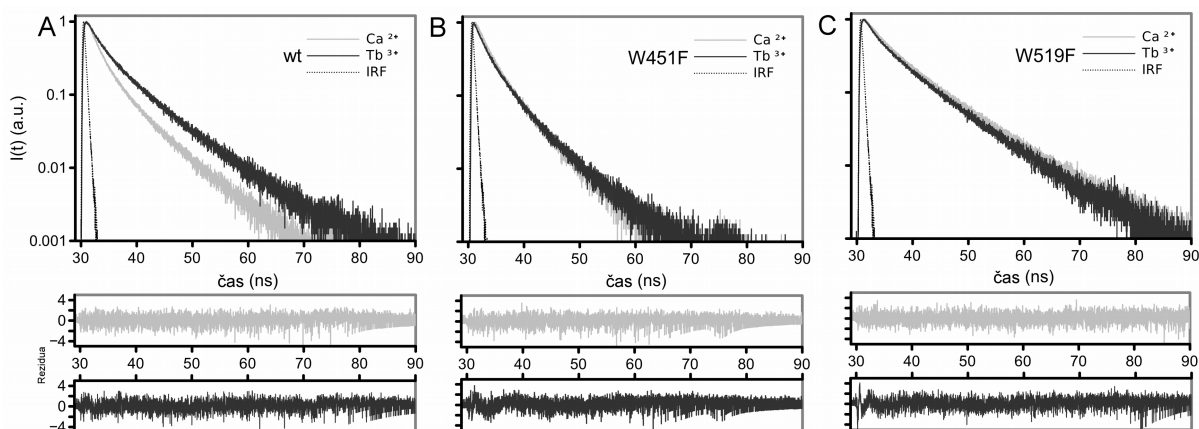
Obr. 17: Excitační spektra Tb^{3+} různých koncentrací Tb^{3+} (emise 545 nm); volné Tb^{3+} v pufru HEPES (A), Tb^{3+} s proteinem SPM (B), Tb^{3+} s AFQ peptidem (C); vložené grafy znázorňují normalizovaná excitační spektra Tb^{3+} (1 mM) volného (A) a v přítomnosti příslušného peptidu (B a C). Tečkovaná čára (B a C) představuje normalizované excitační spektrum Trp v AFQ (emise 340 nm) pro srovnání se excitačním spektrem naměřeným pro emisi 545 nm.

4.7.2 Časově rozlišená intenzita fluorescence Trp v SPM

Aby bylo možné kvantifikovat rezonanční energetický přenos energie mezi tryptofanem (donor energie) na Tb^{3+} iontem (akceptor energie) navázaný na SPM protein, bylo nutné použít časově rozlišené měření intenzity fluorescence tryptofanu. Byla měřena tzv. doba života excitovaného stavu („lifetime“) tryptofanu u SPM s navázaným Ca^{2+} nebo Tb^{3+} (Obr. 18A-C). Doba života excitovaného stavu tryptofanu v SPM s Ca^{2+} byla kontrola, ke které bylo vztaženo zkrácení doby života vlivem přenosu energie z Trp na Tb^{3+} . Z tohoto rozdílu byla stanovena efektivita energetického přenosu.

Ve všech případech jsme předpokládali multi-exponenciální průběh dohasínání fluorescence, naměřená data tedy byla analyzována proložením jedno-, dvou- a tří-exponenciálním modelem, výsledky se lišily hodnoty χ^2 s a také přesností

určení jednotlivých dob života, které se v případě nižšího rozlišení u dvou-exponenciálního modelu průměrují.



Obr. 18: Časově rozlišená intenzita fluorescence tryptofanu SPM (5 μ M) v (A) wt SPM, (B) mutantu W451F a (C) W519F na škále ns, proteiny v přítomnosti Ca^{2+} (světle šedá) a Tb^{3+} (tmavě šedá). Měření pomocí TCSPC („time-correlated single photon counting“) po excitaci pulzní diodou 295 nm s délkou pulzu 600 ps pro emisi 350 nm při 10 °C.

K porovnání dob života byl použit výsledek tří-exponenciálního modelu, z kterého vyplynuly jednotlivé přispívající doby života fluorescence a hodnoty jejich dílčích příspěvků k celkové době života (Tab. 2). První a druhá komponenta doby života (τ_1 a τ_2) byla u všech tří variant SPM s navázaným Tb^{3+} zkrácena v porovnání se stavem s navázaným Ca^{2+} . V případě wt SPM a SPM-W451F byla hodnota τ_1 (a odpovídající míra příspěvku) po navázání Tb^{3+} zkrácena zhruba o jeden řád, kdežto v případě SPM-W451F došlo k poklesu 2.5- až 1.5-krát. Nejdelší komponenta τ_3 byla zkrácena pouze v případě SPM-W519F, u SPM-W451F zůstala tato komponenta téměř nezměněna a v případě SPM-wt byla dokonce prodloužena. Dílčí příspěvek této komponenty, B_3 , však stoupl ve všech případech všech variant proteinů SPM.

	τ_1	τ_2	τ_3	B_1	B_2	B_3	$\tau_{ave} (ns)$	X^2
wt + Ca²⁺	1.4	3.3	7.4	0.296	0.392	0.313	4.0	0.99
wt + Tb³⁺	0.1	2.5	7.7	0.037	0.358	0.605	5.5	1.12
W451F + Ca²⁺	1.0	2.8	6.4	0.119	0.575	0.306	3.7	0.97
W451F + Tb³⁺	0.1	2.2	6.2	0.096	0.464	0.440	3.7	0.96
W519F + Ca²⁺	1.4	4.4	9.4	0.061	0.367	0.572	7.1	0.98
W519F + Tb³⁺	0.6	3.1	8.3	0.041	0.278	0.681	6.5	1.00

Tab. 2: Shrnutí časově rozlišené fluorescence tryptofanu v proteinech SPM. Histogram dohasínání fluorescence byl analyzován pomocí tří-exponenciálního modelu. Indexy označují jednotlivé komponenty dob života (dohasínání) (τ (ns)), jejich příspěvek k celkové intenzitě (B (%)), průměrná doba života excitovaného stavu (τ_{ave} (ns)). Proteiny SPM byly v koncentraci 100 μ g/ml, koncentrace CaCl₂ byla 2 mM, Tb(NO₃)₃·5H₂O byla 200 μ M. Emise tryptofanu byla měřena při 360 nm v geometrii polarizátorů pod „magickým úhlem“ po excitaci při vlnové délce 295 nm (viz Materiál a metody).

Čtyř-exponenciální model oproti tří-exponenciálnímu již nepřinášel nové informace, ani statistické zlepšení výsledku analýzy. U dvou-exponenciálního modelu (Tab. 3) byl pokles kratší komponenty τ_1 menší než u tří-exponenciální, výsledná průměrná doba života τ_{ave} , ze které je efektivita přenosu energie vypočítávána, srovnatelná.

	τ_1	τ_2	B_1	B_2	$\tau_{ave} (ns)$	X^2
wt + Ca²⁺	1.8	6.3	0.517	0.484	4.0	1.03
wt + Tb³⁺	2.0	7.4	0.325	0.675	5.6	1.41
W451F + Ca²⁺	2.0	5.5	0.517	0.483	3.7	1.13
W451F + Tb³⁺	1.2	5.1	0.342	0.658	3.8	3.27
W519F + Ca²⁺	3.0	8.8	0.299	0.701	7.0	1.11
W519F + Tb³⁺	2.0	7.8	0.227	0.773	6.5	1.17

Tab. 3: Shrnutí časově rozlišené fluorescence tryptofanu v proteinech SPM. Histogram dohasínání fluorescence byl analyzován pomocí dvou-exponenciálního modelu.

Jednotlivé komponenty, τ_1 , τ_2 a τ_3 , a jejich dílčí příspěvky, B_1 , B_2 a B_3 , z tří-exponenciálního modelu byly použity pro výpočet průměrné doby života, která byla použita pro výpočet efektivitu rezonančního energetického přenosu z Trp na Tb³⁺ a také pro výpočet vzdálenosti energetického donoru a akceptoru (Lakowicz, 2007).

Protože s navázaným iontem Tb^{3+} došlo ke zkrácení průměrné doby života excitovaného stavu fluorescence tryptofanu v SPM oproti stavu s navázaným Ca^{2+} , byla existence energetického přenosu předpokládána a výpočet vzdálenosti tryptofanu k navázanému Tb^{3+} byl řešitelný. Nicméně tento postup mohl být realizován pouze v případě SPM-W519F, které vykazovalo prokazatelně zkrácení doby života excitovaného stavu tryptofanu (z 7.1 ns s navázaným Ca^{2+} na 6.5 ns s navázaným Tb^{3+}), zatímco u SPM-W451F zůstal téměř nezměněn a u wt SPM došlo v přítomnosti akceptoru energie dokonce k prodloužení průměrné doby života (Tab. 2).

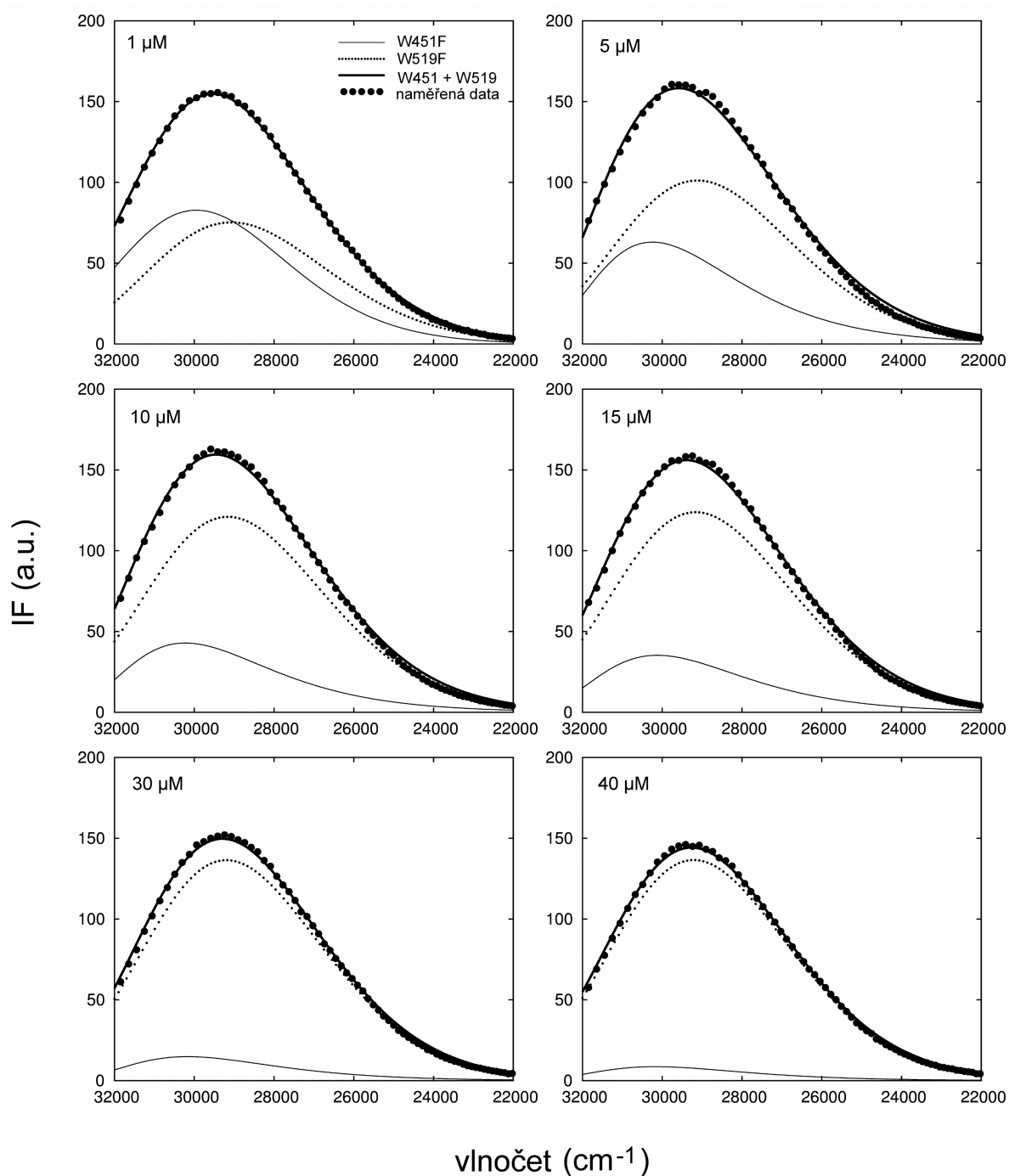
Vzdálenost mezi donorem energie Trp₄₅₁ a Tb^{3+} byla stanovena v souladu s Försterovou teorií o migraci energie excitovaného stavu (Förster, 1948) na 6.2 Å (pro kritickou vzdálenost Trp- Tb^{3+} 3.35 Å podle (Horrocks and Collier, 1981)) nebo 5.08 Å (pro kritickou vzdálenost 4.1 Å podle (Canada and Paltoo, 1998)).

Tento neočekávaný výsledek, kdy u wt SPM došlo po navázání Tb^{3+} iontů k prodloužení doby života excitovaného stavu fluorescence tryptofanu nemůže být s použitím těchto měření vysvětlen, musela být do úvah vzata i dekonvoluce spekter Trp. U wt SPM po vazbě Tb^{3+} dochází u Trp₄₅₁ ke zkrácení nejkratší komponenty doby života τ_1 , dojde ale také k úbytku jejího relativního příspěvku k celkové intenzitě fluorescence B_1 . V celkové intenzitě tedy převládá relativní příspěvek Trp₅₁₉, která má celkově delší dobu života excitovaného stavu, což má ve výsledku za následek celkové prodloužení doby života excitovaného stavu u wt SPM. Tyto výsledky jsou součástí první publikace.

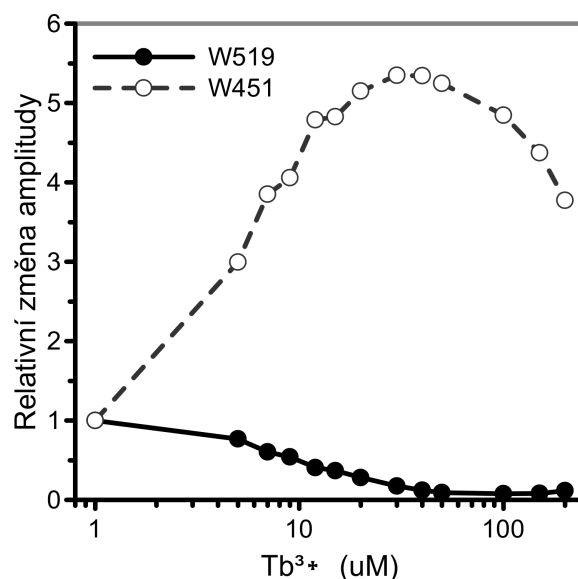
4.8 Dekonvoluce emisních spekter Trp ve wt SPM

Z výsledků popsanych v předešlých kapitolách bylo odvozeno, že Ca^{2+} iont může být v SPM substituován Tb^{3+} iontem a že enzymatická aktivita FrpC proteinu zůstane zachována, je-li navázáno Tb^{3+} . Podobně i sbalování mutantních variant proteinů SPM, SPM-W519F a SPM-W451F, má podobný průběh z pohledu pozice emisního maxima tryptofanu, je-li navázán iont Ca^{2+} nebo Tb^{3+} . Sbalování wt SPM nicméně vykazuje velké rozdíly ve spektrálním posunu emisního maxima tryptofanu mezi těmito dvěma ionty. Tento rozdíl patrně plyne z toho, že emisní spektrum wt SPM je součtem intenzit obou jednotlivých tryptofanů, které se v wt SPM mohou oproti mutantům chovat rozdílně na základě odlišného okolí tryptofanu. Důležitou

informaci zde může poskytnout rozlišení obou tryptofanů Trp₅₁₉ a Trp₄₅₁, které se nacházejí v blízkosti navázaného Tb³⁺ iontu, v rámci emisního spektra wt SPM. Na Obr. 19 je náhled emisních spekter reálně naměřených na wt SPM a spekter mutantních proteinů SPM, jejichž tvar byl modelován, že byla zachována pozice emisního spektra naměřeného, ale celková intenzita jednotlivých komponent (Trp₅₁₉ a Trp₄₅₁) byla vypočítána v procesu dekonvoluce tak, aby součtem jejich intenzit mohlo ve výsledku vzniknout spektrum wt SPM. Na Obr. 20 jsou znázorněny intenzity jednotlivých komponent Trp₅₁₉ a Trp₄₅₁ ve variantách SPM s jedním tryptofanem jako relativní příspěvek do spektra wt SPM jako funkce koncentrace Tb³⁺. Intenzita fluorescence Trp₄₅₁ (SPM-W519F), která byla prokazatelně zhášena iontem Tb³⁺ zde má téměř stejný průběh jako u naměřeného spektra Trp₄₅₁ v SPM-W519F. Reziduum Trp₅₁₉ (SPM-W451F) se naopak zdá být v případě wt SPM zhášen téměř až k nulové intenzitě fluorescence. Pokud dekonvoluce spekter wt SPM reflektuje skutečnost, která probíhá ve wt SPM, pokud váže Tb³⁺ ionty, znamenalo by to, že u Trp₅₁₉ také dochází ke zhášení fluorescence. Toto zhášení však zcela jistě neprobíhá jako dynamické zhášení, které by bylo prezentováno zkrácením doby života excitovaného stavu Trp₅₁₉, ale jako spíš jako statické zhášení, dochází pouze k redukci celkové intenzitě fluorescence. Je tedy možné, že k Trp₅₁₉ je navázán Tb³⁺ iont v takové blízkosti, že je zamezeno emisi fotonu, aniž by byly ovlivněny rychlostní konstanty zářivých přechodů. Tomu by nasvědčoval i fakt, že při časově rozlišeném měření byla intenzita obou tryptofanů neměřena odlišná od měření ustálené fluorescence (počet fotonů nasbíraných za sekundu vs. integrovaná intenzita). Tato skutečnost by podporovala hypotézu vyjádřenou v diskuzi, že k vazbě Tb³⁺ do blízkosti Trp₅₁₉ dochází prostřednictvím K⁺- π interakce. Tyto výsledky jsou součástí první publikace.



Obr. 19: Dekonvoluce emisních spekter tryptofanu v SPM při titraci Tb^{3+} , naměřená spektra (černé puntíky) byla rozložena na jednotlivá spektra přispívajících tryptofanů Trp₄₅₁ (tečkovaná čára) a Trp₅₁₉ (přerušovaná čára), kdy pozice maxima emisního spektra daného tryptofanu odpovídala naměřeným datům pro varianty SPM s jedním tryptofanem v dané koncentraci Tb^{3+} tak aby jejich součet ve výsledku dal spektrum wt SPM. Reprezentativní koncentrace.



Obr. 20: Relativní změna příspěvku jednotlivých tryptofanů (Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉) do celkové intenzity fluorescence tryptofanu ve wt SPM při titraci Tb³⁺, data vycházejí z Obr. 19.

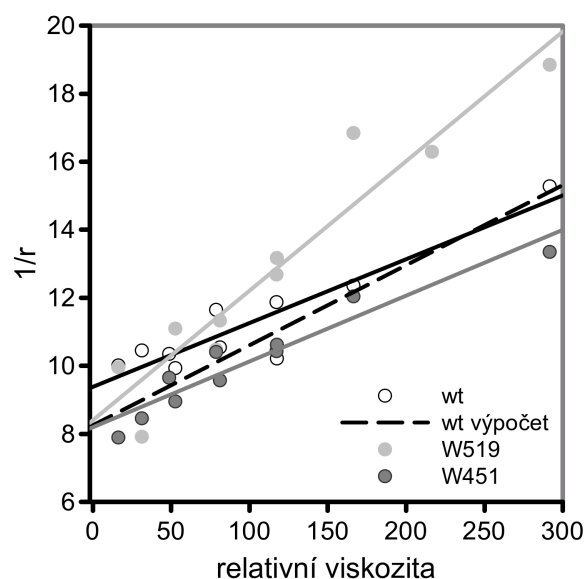
4.9 Steady-state anizotropie Trp v SPM a Perrinovo vynesení

V předchozích kapitolách byla zkoumána možnost, že se Tb³⁺ iont (ionty) navazuje do blízkosti tryptofanu z důvodu mapování topologie vazebného místa SPM pro Ca²⁺ iont a také proto, že vazba Tb³⁺ iontu ovlivňuje fluorescenční vlastnosti tryptofanu v proteinu SPM. Vazba iontu byla přímo potvrzena pro Trp₄₅₁ a naznačena nepřímo pro Trp₅₁₉. Vzhledem ke skutečnosti, že emise indolu může být ovlivněna svým okolím více způsoby a že pomocí NMR (P. Macek, nepublikované výsledky) byla naznačena možnost vzájemné blízkosti obou tryptofanů, musela být možnost rezonančního přenosu z jednoho tryptofanu na druhý (homoFRET) vzata do úvahy o popisu topologie vazebného místa v SPM.

Stanovení efektivity rezonančního přenosu energie mezi stejnými molekulami je složitější oproti přenosu mezi různými molekulami proto, že absorpce i emise se uskutečňuje na stejných vlnových délkách. Možnost homoFRETu lze nastítn pomocí stanovení změny geometrie systémů, kde je homoFRET umožněn (wt SPM) a systému, kde homoFRET není možný (u variant SPM s jedním tryptofanem). Jako první bylo zvoleno měření anizotropie fluorescence ve steady-state nastavení. Jak bylo popsáno, anizotropie fluorescence (ustáleného stavu) tryptofanu v SPM (wt SPM, SPM-W451F, SPM-W519F) byla měřena a vynesena jako funkce viskozity prostředí. Toto Perrinovo vynesení dovoluje extrapolovat limitní anizotropii r_0 , (závisí

na úhlu mezi excitačním a emisním tranzičním dipólem fluoroforu podle $r_0 = 2/5 * ((3\cos^2\Phi - 1)/2)$, která je vlastností samotného tryptofanu a není tedy závislá na rotační difuzi celého proteinu. Neodpovídala-li by za daných podmínek (imobilizace proteinu) hodnota limitní anizotropie tryptofanu v wt SPM hodnotě limitní anizotropie v SPM-W451F a SPM-W519F, bylo by možné předpokládat, že v wt SPM dochází k ovlivnění emise tryptofanu blízkostí druhého tryptofanu, tedy by to poukazovalo na možnost rezonančního energetického přenosu mezi oběma tryptofany. Měření probíhalo na proteinech v pufru s 2 mM CaCl₂. Různá viskozita ((T/η) v jednotkách [K/P], pro jednoduchost popsána jako relativní viskozita) byla zajišťována různou koncentrací glycerolu v pufru a měnící se teplotou prostředí tak, aby protein současně zůstal v nativní konformaci.

Lineární regresí naměřených dat byla pro oba mutantní proteiny, SPM-W451F a SPM-W519F, nalezena podobná hodnota výseku na ose Y 8.4 a 8.03, která odpovídá limitní anizotropii r_0 0.119 a 0.125 (Tab. 4). V grafickém znázornění Obr. 21 je patrné, že lineární regrese obou mutant protínají osu Y v přibližně stejném místě. Hodnota výseku osy Y pro lineární regresi hodnot naměřených pro wt SPM je 9.38, odpovídá limitní anizotropii okolo 0.107. Tato hodnota se neshoduje s předpokládanou hodnotou pro tryptofan naměřenou na mutantách SPM. Této hodnotě neodpovídá ani hodnota anizotropie vypočítaná (dle pravidla aditivity anizotropie) z obou jednotlivých anizotropií tryptofanů v mutantních proteinech SPM vážená na totální anizotropii jednotlivých komponent. Tento výsledek tedy naznačuje, že v okamžiku mezi absorpcí a emisí fotonu v wt SPM může docházet k ovlivnění polarizace tohoto systému, kterým v zadaných podmínkách může být rezonanční energetický přenos mezi oběma tryptofany. Touto možností jsme se tedy dále zabývali v dalším experimentu, který byl nastaven tak, aby bylo možné rezonanční energetický přenos mezi oběma tryptofany v wt SPM potvrdit, ale bylo by možné také alespoň přibližně stanovit konfiguraci obou tryptofanů. Tyto výsledky nejsou součástí první publikace.



Obr. 21: Perrinovo vynesení převrácené hodnoty anizotropie fluorescence tryptofanu v proteinech SPM (wt, W451F a W519F) jako funkce relativní viskozity prostředí. Přerušovaná čára znázorňuje teoretický průběh změny anizotropie fluorescence tryptofanu wt SPM vypočítaný z naměřených hodnot anizotropie fluorescence jednotlivých tryptofanů u variant SPM s jedním tryptofanem vážených jejich relativním příspěvkem, amplitudou, dle pravidla aditivity anizotropie fluorescence.

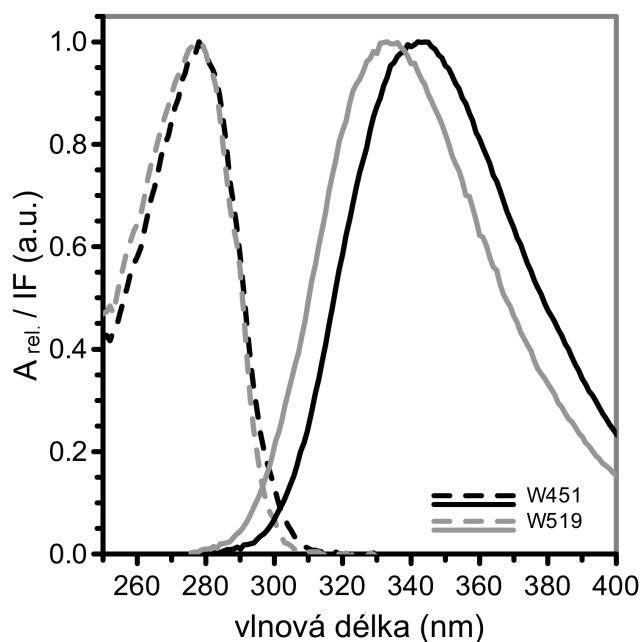
	výsek $1/r$	r_0	úhel
wt	9.38	0.107	44.3 °
wt výpočet	8.25	0.121	43.0 °
W519	8.40	0.119	43.2 °
W451	8.03	0.125	42.6 °

Tab. 4: Hodnoty výseku na ose Y, odpovídající teoretické hodnoty limitní anizotropie fluorescence a odpovídajícího úhlu mezi excitačním a emisním tranzičním dipólem tryptofanu u wt SPM a variant SPM s jedním tryptofanem (W451F a W519F) a pro teoretickou hodnotu vypočítanou pro wt SPM – výpočet, vychází z Obr. 4.9.

4.10 Rámcové určení vzdálenosti a dihedrálního úhlu mezi dvěma Trp ve wt SPM

Rezonanční přenos energie mezi dvěma tryptofany je umožněn částečným překryvem absorpčního a emisního spektra. V případě jednotlivých tryptofanů v SPM je absorpční spektrum Trp₄₅₁ posunuté do červené oblasti oproti Trp₅₁₉ (a emisní spektrum Trp₅₁₉ je současně posunuto do modré oblasti, Obr. 22). Velikost

spektrálního překryvu je by tedy naznačovala preferenční umožnění homoFRETu ve směru Trp₄₅₁→Trp₅₁₉. Tato možnost ale nebyla dále analyzována, tyto výsledky nejsou součástí první publikace.



Obr. 22: Absorpční (přerušované čáry) a emisní (plné čáry) spektra Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉ u variant SPM s jedním tryptofanem s navázaným Ca²⁺. Hodnoty absorbance i intenzity fluorescence tryptofanu byly normalizované na maximum, názorně lze porovnat překryv absorpčního a emisního spektra.

Vzájemná blízkost obou tryptofanů v proteinu SPM byla naznačena také pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu, kde na spektru wt SPM byl změřen pozitivní peak na 230 nm, který odpovídá tzv. „exciton coupling“ interakci dvou aromatických molekul indolu (π - π interakce, (Eisinger, 1969; Grishina and Woody, 1994; Ohmae et al., 2001)). Bylo tedy vhodné prozkoumat blíže wt SPM s ohledem na výskyt rezonančního přenosu energie mezi oběma tryptofany (homoFRET). Znalost efektivity přenosu energie spolu s výsledky NMR spektroskopie (Kubáň et al., 2015) by mohly lépe dotvořit představu o relativní orientaci a vzdálenosti mezi oběma tryptofany a navázanými ionty.

K tomuto účelu byl zvolen experimentální přístup časově rozlišeného měření anizotropie fluorescence tryptofanu v podmínkách, kdy celému proteinu byl zamezen rotační pohyb v roztoku zamrazením v tzv. skelné fázi (glass phase, protein v roztoku glycerolu 73 % (v/v) při teplotě -70 °C, teplota a koncentrace byly zvoleny s ohledem na maximální dosažitelnou viskozitu glycerolu v maximální (nejméně dosažitelné) dosažitelné teplotě (Lakowicz et al., 1983; Vincent et al., 2000)). V

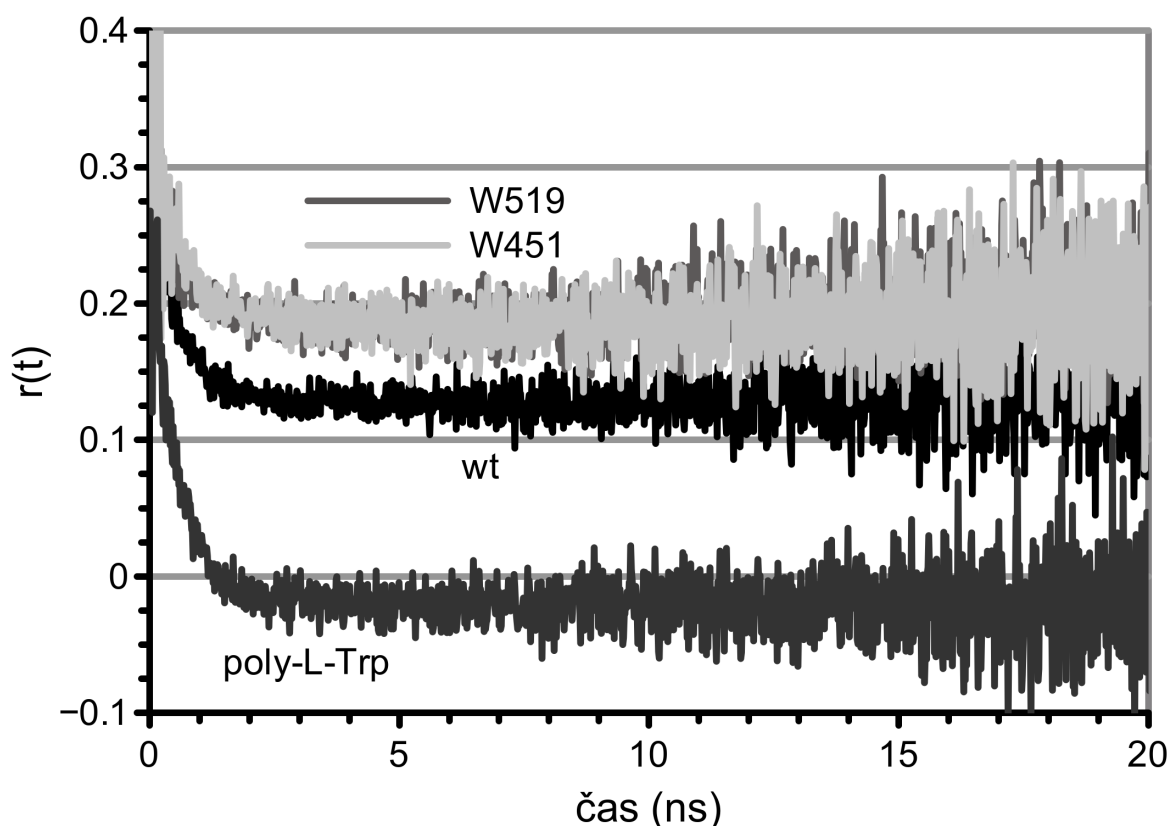
tomto nastavení by dominující roli měly hrát depolarizační procesy nesouvisející s pohybem molekuly v roztoku, ale depolarizace vlivem rezonančního přenosu energie.

Experiment byl jako kontrolní proveden se všemi třemi variantami SPM nejdřív v teplotě 10 °C, kde byl vždy naměřen krátký korelační čas okolo 0.3-0.5 ns odpovídající segmentárnímu pohybu samotného indolu (konický prostor vymezující volnost pohybu bočního řetězce tryptofanu) a dlouhý korelační čas okolo ~16-20 ns odpovídající rotačnímu pohybu proteinu v roztoku. Tento dlouhý korelační čas souhlasí s aproximací pro SPM, tedy kulový objekt o velikosti 18.7 kDa. Ve všech případech převládá pohyb celého proteinu nad rotační difuzí indolu, amplituda delšího korelačního času se pohybuje okolo 94-98 % (nepublikované výsledky).

V případě, kterému jsme se v tomto experimentu snažili přiblížit podobně jako při Perrinově vynesení, že je imobilizace proteinu v roztoku, kdy tryptofan emituje jako izolovaný/samostatný fluorofores víceméně nezávislý na svém okolí. Očekávali jsme tedy, že obě varianty SPM s jedním tryptofanem, u kterých není homoFRET možný, by měly vykazat stejnou míru depolarizace fluorescence a budou sloužit jako negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla zvolena molekula poly-L-Trp (fragменты 15-50 kDa, Sigma-Aldrich), u které lze předpokládat vysokou míru depolarizace vlivem homoFRET (DDEM, donor-donor energy migration), který navíc může probíhat v hojné míře v nejrůznějších konfiguracích párů donorů a akceptorů, tedy zcela nespecificky (tento předpoklad byl potvrzen měřením anizotropie fluorescence ustáleného stavu, kdy hodnota anizotropie byla okolo 0.04 na rozdíl od všech proteinů SPM 0.15, nepublikované výsledky).

Výsledek tohoto měření (Obr. 23) je křivka anizotropie fluorescence tryptofanu v čase na škále ns, která klesá z teoretické limitní/fundamentální anizotropie u všech vzorků (pro indol $r_0 \sim 0.4$ (Ichiye and Karplus, 1983; Lakowicz, 2007)), je charakterizována rotačním korelačním časem, který se odehrává v průběhu dohasínání samotného tryptofanu. Tento korelační čas je kratší než 1 ns, k depolarizaci fluorescence tedy dochází za méně než 1 ns po excitaci, což je vysvětleno segmentárním pohybem indolu, který stále přetrvává i po imobilizaci proteinu. Jiným vysvětlením této rapidní depolarizace by bylo mísení dvou tranzičních stavů indolu, 1L_a a 1L_b , které je ovšem nepravděpodobné z důvodu dlouhovělné excitace tryptofanu při 295 nm. Nicméně tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými výsledky (Ichiye and Karplus, 1983; Lakowicz et al., 1983). Po

této rychlé depolarizaci fluorescence tryptofanu je anizotropie r_∞ již stabilní a nabývá různých hodnot okolo 0.180 a 0.134 pro varianty SPM s jedním tryptofanem a wt SPM.



Obr. 23: Anizotropie fluorescence tryptofanu v čase na škále ns pro všechny varianty SPM měřená v pufru s Ca^{2+} s glycerolem 73 % (v/v) při teplotě -73°C zajištěné kryostatovou komorou Optistat DN. Depolarizace fluorescence tryptofanu byla zaznamenávána systémem TCSPC („time-correlated single photon counting“) po excitaci pulzní diodou 295 nm s délkou pulzu 600 ps pro emisi 350 nm. Vzorek poly-L-Trp byl rozpuštěn v DMSO a ethylenglykolu a sloužil jako pozitivní kontrola pro totální depolarizaci fluorescence vlivem FRET.

Pokles anizotropie v čase má pro oba mutantní proteiny SPM identický průběh, jejich zbytková anizotropie zůstává i po rychlé depolarizaci na vysoké hodnotě. U pozitivní kontroly poly-L-Trp dochází k totální depolarizaci vlivem častého energetického přenosu mezi jednotlivými indoly, který je zde potvrzen poklesem anizotropie fluorescence na hodnotu blízkou 0 (-0.03). V případě wt SPM je zbytková anizotropie r_∞ na hodnotách okolo 0.134 a 0.143 pro proteiny s navázaným Ca^{2+} a Tb^{3+} (nepublikovaná data).

Výsledná hodnota r_∞ proteinu wt SPM je tvořena dvěma druhy komponent, první je tvořena přímou emisí tryptofanů následující po excitaci, druhá je tvořena

emisí energie, která byla přijata rezonančním přenosem (teoreticky fungující oběma směry). Při aproximaci úhlů mezi excitačními a emisními tranzičními dipóly (L_a-L_a), jak jsou nastaveny v wt SPM, byla brána do úvahy aditivita anizotropie fluorescence a hodnocena pomocí funkce: $\beta = \arccos((\sqrt{5 \cdot r_{\text{depol}} + 1}) / \sqrt{3})$, kde β je průměrný úhel mezi tranzičními dipóly a r_{depol} je anizotropie molekuly akceptoru. Naměřená anizotropie $r^\infty = 0.138$ je kombinací různých anizotropií vyplývajících z probíhajícího energetického přenosu, kterým náleží různé hodnoty anizotropie.

Při navrhování reálného úhlu mezi oběma tryptofany v proteinu SPM byly v úvahu také matematické možnosti tohoto parametru, aby bylo možné říci, vzhledem ke složitosti celého emitujícího systému, který výsledek je více pravděpodobný.

V případě, že by tranziční dipóly indolů L_a-L_a svíraly úhel blízký 90° , depolarizovaná komponenta by měla mít hodnotu anizotropie okolo -0.200 (zcela depolarizovaná fluorescence). Tato komponenta by reálně mohla dosahovat maximálně 16% zastoupení v celkové anizotropii (odpovídající efektivita přenosu energie je 16 %), aby celková anizotropie r^∞ mohla nabývat hodnot naměřených u wt SPM, 0.13. Teoreticky by tato úhlová konfigurace umožňující rezonanční energetický přenos vyžadovala velmi blízkou vzdálenost obou indolů.

Při náhodné orientaci obou indolů, které by odpovídal magický úhel 54.7° , depolarizovaná složka anizotropie by měla hodnotu 0 a musela by zaujímat $\sim 31\%$ celkové intenzity.

Nejvyšší teoreticky možná hodnota anizotropie akceptoru energie je blízká 0.138, což by znamenalo, že 100 % emitovaných fotonů pochází z rezonančního přenosu energie, což by znamenalo $\sim 100\%$ efektivitu přenosu energie a průměrný úhel mezi dipóly okolo 41° .

Pomocí těchto úvah jsme dospěli k závěru, že nejpravděpodobnější průměrný úhel mezi tranzičními dipóly indolů se pohybuje v rozmezí $41-55^\circ$ s průměrnou efektivitou přenosu energie pohybující se mezi 100-30 %. Pokud vycházíme z hodnoty kritické Försterovské vzdálenosti $R_0 = 13.9 \text{ \AA}$ stanovené pro absorpční a emisní spektra obou tryptofanů naměřené na varianty SPM s jedním tryptofanem (Obr. 22), tyto hodnoty efektivit přenosu energie by měly odpovídat vzdálenosti indolů menší než 8 \AA . Tyto výsledky jsou součástí první publikace.

4.11 Analýza konfigurace tryptofanů v proteinech se známou strukturou publikovaných v databázi PDB

Během charakterizace vazebného místa pro Ca^{2+} v SPM vyvstaly nejasnosti v souvislosti s intenzitou fluorescence Trp. Součet intenzit fluorescence Trp jednotlivých mutantních variant nesoucích jedno Trp reziduum neodpovídal intenzitě wt SPM, současně se také odlišovaly intenzity fluorescence Trp po navázání různých iontů, Ca^{2+} a Tb^{3+} . Výsledky Perrinova vynesení (anizotropie fluorescence Trp v prostředích s různou viskozitou) naznačili, že oba Trp se mohou nacházet ve vzájemné blízkosti, kdy dochází k rezonančnímu přenosu energie (homoFRET), toto podezření bylo následně částečně potvrzeno pomocí NMR (P. Macek, nepublikované výsledky) a homoFRET mezi oběma rezidui Trp byl následně potvrzen pomocí časově rozlišené anizotropie fluorescence Trp. Stanovení konfigurace těchto reziduí pomocí fluorescenčních metod je spíše přiblížením se nejpravděpodobnějšímu intervalu vzájemných úhlů a vzdáleností. Vzhledem k literárním údajům je patrné, že stabilizace terciární struktury proteinů pomocí π - π interakce aromatických bočních řetězců aminokyselin je reálná (Burley and Petsko, 1985), a pokud v SPM existuje evidence o blízkosti obou reziduí Trp, může se tato interakce účastnit i stabilizace struktury SPM. Tato π - π interakce má, vzhledem k účasti π -elektronů aromatického kruhu, požadavky na konfiguraci vazebných partnerů. Tato konfigurace je současně předmětem diskuzí. Nicméně pokud je π - π interakce natolik běžnou stabilizační silou, měla by rezidua dvou blízkých Trp podléhat nějaké tendenci. Tuto tendenci jsme se pomocí statistického zpracování struktur z PDB snažili odhalit. Současně jsme také chtěli zjistit, jaké tendence panují v konfiguraci dvou Trp, mezi kterými dochází k homoFRETu, a které specificky stáčí rovinu cirkulárně polarizovaného světla vzdálené UV oblasti (exciton).

Pokud by některá konfigurace dvou Trp byla skutečně globálně významnou pro stabilizaci struktur proteinů, mohla by se vyskytovat hojněji, což by důmyslným statistickým zpracováním PDB mělo být odhalitelné.

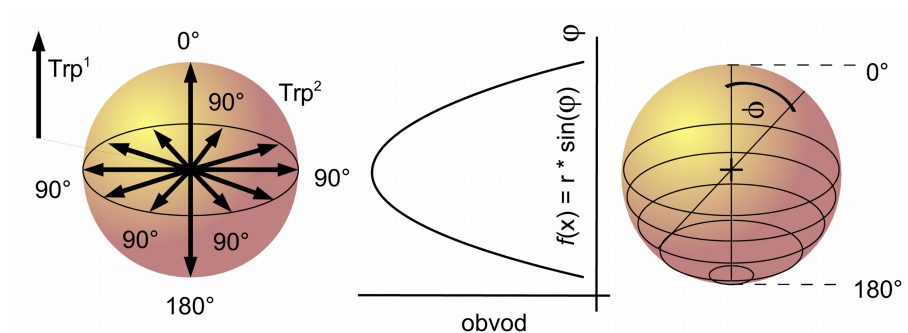
Tento úkol je součástí diplomové práce Bc. Alberta Sokola, který programuje databázovou aplikaci, pomocí které lze analyzovat konfiguraci tryptofanů v proteinových strukturách nahraných do PDB. Jako vstupní data byly určeny struktury vyřešené pomocí rentgenové krystalografie. Každá dvojice Trp byla vybrána, aby se nacházela na stejném řetězci, jako vstupní množina bylo vybráno ca 10^6 Trp-Trp párů (v rámci ca 2.1×10^5 proteinových struktur).

Zásadním problémem je skutečnost, že struktury některých proteinů se v PDB nacházejí hojněji, tyto konfigurace Trp-Trp jsou tedy zdánlivě nabohaceny, ačkoliv ke stabilizaci nejpravděpodobněji nepřispívají. Jedná se zejména o struktury proteinů s bodovými mutacemi, nebo např. protilátky, proteiny virionů, často zkoumané enzymy, buněčné receptory. Filtrování redundantních struktur je tedy potřeba provádět nejen podle názvu a přesné sekvenční shody, ale i sekvenční podobnosti (A. Sokol, nepublikované výsledky). Tato skutečnost je často jinými autory zcela opomíjena.

Dalším omylem, se kterým se jiní autoři setkali a nechali se zmýlit, je fakt, že výstupem histogramů úhlů normál mezi rovinami Trp (ale i Tyr, Phe, His a jiných molekul), je křivka s maximem 90° . Uzavírají tak své práce, že stabilizující interakcí je struktura dvou aromatických aminokyselin na sebe navzájem kolmých. Toto ovšem lze uzavřít i pro velmi vzdálené molekuly, u kterých již elektrostatická interakce nemůže působit (např. 50 \AA). Důvodem tohoto omylu je chybná úvaha o fungování souřadnicového systému, kdy vztahujeme orientaci (pozici) objektu vzhledem k jinému objektu a hodnotíme tyto orientace (pozice) na základě navzájem kolmých os xyz každého objektu. Pozorovaný histogram ve skutečnosti znamená náhodný výskyt konfigurací, který je dán širší možností vyskytovat se různých postaveních v kolmém postavení oproti paralelnímu. Náhodné uspořádání dvou těles v kartézském prostoru má tedy sinusovou závislost, co se týká jejich vzájemných úhlů (Obr. 24). Ideálním řešením by bylo zohlednit sinusovou závislost a v histogramech hledat odchylky četností výskytů právě od funkce $\sin(x)$. Pro jednoznačné určení konfigurace dvou objektů (definovaných pomocí tří navzájem kolmých os) je přitom potřeba 9 úhlů, azimut, elevace, vzdálenost. Jiné přístupy neumožní přesný popis, neobjeví redundance, ukazují prostorově nepříbuzné struktury v jedné skupině. Zkoumat vzájemnou orientaci molekul bez zohlednění jejich pozice nemá také smysl. Stejně tak není možné zobecňovat experimentální poznatky nabyté na molekulách benzenu (Sinnokrot et al., 2002), zejména mají-li simulovat indol, který je díky pyrrolovému kruhu asymetrický a chirální.

Reálné tendence, které řídí konfigurace dvou planárních molekul na krátké vzdálenosti, jsou spíše prozaické a s elektrostatickou interakcí v některých případech nutně nesouvisí. Konfigurace Trp-Trp mohou být vynucené sterickými okolnostmi, např. paralelní uspořádání je preferované pro velmi blízké molekuly (měřeno jako vzdálenost dvou těžišť aromatických postranních řetězců), protože na krátkou vzdálenost se jinak uspořádat ani nemohou. Uspořádání v rámci

sekundárních struktur je pak dáno podle toho, kde se Trp-Trp vyskytovat “může” (sekundární struktura, sekvenční separace, vzdálenost), než kde by byl preferenčně na základě interakce. Např. v napřímeném β -vlákne jsou indoly Trp-Trp dipeptidu velmi vzdálené, podélnými osami vzájemně antiparalelní.



Obr. 24: Schematické znázornění teoretické četnosti úhlů mezi normálami dvou molekul: pro dvojici náhodně orientovaných normálových vektorů je pravděpodobnost (P) výskytu daného úhlu dána funkcí $P(\phi) = k \cdot \sin(\phi)$. To je dáno tím, že na povrchu koule je vyšší pravděpodobnost náhodného výskytu (úhlu) na kruhu s větším poloměrem (“rovník”) oproti vrcholu (“pól”).

Největší chybu při statistickém hodnocení PDB pak generuje samotný výběr dat, kdy již vstupními požadavky je zvolena určitá podmnožina molekul s určitými vlastnostmi (např. analýza pouze prostorově blízkých molekul). Výskyt vlastností nalezených u takové skupiny molekul je pak pouze podmíněnou pravděpodobností daného výskytu a neodráží tak reálné tendence skutečného světa. Tyto výsledky jsou součástí připravované publikace.

5 Diskuse

FrpC protein byl představen a jako produkt bakterie *Neisseria meningitidis* s unikátní aktivitou autokatalytického štěpení po vazbě Ca^{2+} nezbytné pro sbalení proteinu, která je nutná pro FrpC proteinu (Osicka et al., 2004), jehož atraktivitu pro výzkum zvyšovala příbuznost s RTX toxiny, tedy s potenciálem zasahovat do patogeneze neisseriové meningitidy (Forman et al., 2003). Vazebná místa pro Ca^{2+} ionty byla předpovězena na základě sekvenční příbuznosti s eukaryotickými motivy vázající Ca^{2+} , tzv. „EF-hands“ (Osicka et al., 2004), popis terciární struktury proteinu FrpC se tedy nabízel jako jedna z vhodných cest výzkumu. Později se ukázalo, že ke stanovení biologické aktivity i struktury části FrpC, která nemá jasné dané sekundární struktury (Kubáň et al., 2015) není možné přistupovat přímočaře běžnými metodami. Jako přiblížení se strukturně-funkčnímu popisu se přiblížila práce (Sadilkova et al., 2008), kde byla identifikovaná nejmenší část FrpC proteinu, která je schopná vykonat svou enzymatickou funkci, tedy vazba Ca^{2+} iontu – sbalení – samoštěpení, tzv. SPM (self-processing module). Chopila jsem se tedy konstruktu SPM s ambicí popsat vazbu iontů, sbalování proteinu a částečně také strukturu vazebného místa pomocí metod fluorescenční spektroskopie, což bylo velmi pošetilé. V této práci předkládám své výsledky a popsané souvislosti mezi vazbou iontů do SPM a dynamikou jeho sbalování, jako i částečný popis vnitro-molekulových vzdáleností mezi navázaným iontem a tryptofanovými rezidui. Takové informace by mohly být nápomocné pro vyřešení struktury proteinu SPM, protože právě SPM zejména ve stavu bez navázaného Ca^{2+} , tedy centrum vazebného místa pro ionty, postrádá dobře definované sekundární struktury (nativní konformace nabude až po vazbě iontu), jak ukázala analýza pomocí spektroskopie cirkulárního dichroismu.

Trojmocné ionty Tb^{3+} byly ve fluorescenční studii použity jako náhražka Ca^{2+} mimo jiné proto, že jejich iontový poloměr se významně neliší. Ionty Tb^{3+} mají schopnost nahradit Ca^{2+} ve stejných vazebných místech (Obr. 11A-B), i samoštěpící aktivita FrpC byla prokázána (Obr. 12). Terbium tedy mohlo být použito ve vazebných experimentech pro stanovení disociační konstanty (k_D) vazebného místa SPM pro kovový iont (Tb^{3+}), která byla stanovena na 17 μM (s Hillovým číslem $n = 1.3$, Obr. 9A). Tato hodnota k_D odpovídá koncentraci, ve které probíhá sbalování SPM indukované vazbou iontů. Současně byl tento pokus proveden i s oběma

variantami SPM s jedním tryptofanem (tryptofan substituován fenylalaninem), jejichž K_D byly srovnatelné s disociační konstantou wt SPM, což jednak naznačuje, že substituce Trp-Phe neovlivňuje vazebnou kapacitu vazebného místa a že Tb^{3+} iont může být uvažován jako plnohodnotný analog Ca^{2+} iontu, alespoň s ohledem na konformační studie prováděné na proteinu SPM.

Na rozdíl od podobné hodnoty disociační konstanty všechny tři varianty SPM, se tyto proteiny podstatně liší v hodnotě maxima dosažené intenzity fosforescence Tb^{3+} (oblast saturace, Obr. 9A-B). Tato skutečnost může odrážet rozdílnost nejbližšího okolí vazebného místa pro Tb^{3+} nebo také rozdílný počet Tb^{3+} iontů navázaných ve vazebném místě SPM. Není tedy možné s jistotou potvrdit, zda varianty SPM s jedním tryptofanem váží méně iontů Tb^{3+} , nebo je-li jimi navázaný iont Tb^{3+} pouze jinak náchylný k zhášení vlivem dostupnosti molekul vody, protože vlivem substituce bylo vazebné místo mírně pozměněno. NMR analýza však potvrdila, že se terciární struktury obou variant mutantních SPM ve sbaleném stavu neodlišují od wt SPM, substituce tryptofanu za fenylalanin tedy nemá na strukturu SPM vážný dopad (P. Macek, L. Bumba, nepublikované výsledky). Předpokládaná stechiometrie vazby iontů na vazebné místo SPM – jedna molekula proteinu SPM váže asi 5 iontů Ca^{2+} , má z tohoto důvodu skutečně smysl pouze u wt SPM. Současně afinita Tb^{3+} iontu oproti Ca^{2+} iontu k vazebnému místu může být vyšší z důvodu většího náboje trojmocného iontu oproti iontu dvojmocnému (Horrocks, 1982).

Jak již bylo zmíněno, konformační změny proteinů SPM navozené vazbou iontů, sledované z pohledu vnitřní fluorescence tryptofanových reziduí, jsou v souladu s výsledky pokusů vazby Tb^{3+} . Obecně lze prohlásit, že se proteiny SPM začínají sbalovat při velmi nízké koncentraci Ca^{2+} zhruba 1-5 μM a při koncentraci 20 μM je proces sbalování dokončen. Navíc mírně rozdílné hodnoty disociačních konstant různých SPM variant korelují s koncentrací Ca^{2+} , ve které je sbalování dokončeno a hodnota dosažené intenzity fluorescence tryptofanu dosáhla svého maxima.

Mezi jednotlivými tryptofanovými rezidui existuje zajímavý rozdíl v ohledu změny intenzity jejich fluorescence, která nastává po navázání iontu (Obr. 15 a Obr. 16). Trp₅₁₉ (SPM-W451F) po vazbě obou iontů slabě snižuje intenzitu fluorescence, kdežto Trp₄₅₁ (SPM-W519F) a také wt SPM zvýší svou intenzitu fluorescence (zhruba od 1-5 μM). Při vyšších koncentracích Tb^{3+} dochází u proteinů

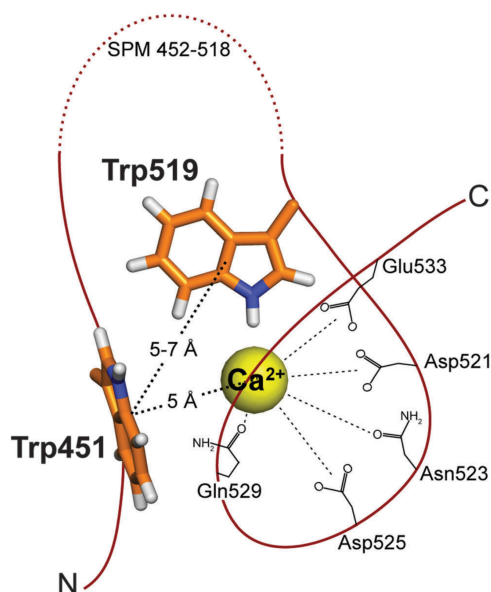
k nápadnému snížení intenzity fluorescence, wt SPM (100 μM) a W519F (20 μM), které se při použití Ca^{2+} neodehrává, fluorescence je stabilní.

Srovná-li se spektrální posun emise jednotlivých tryptofanů u variant SPM s jedním tryptofanem během jejich sbalování, maxima spekter vykazují vlivem solvatochromního efektu významný posun do modré oblasti, v rámci sbalování SPM se tedy oba tryptofany přesunují do hydrofobnějšího centra proteinu a to pro oba vázané ionty, Tb^{3+} i Ca^{2+} . S touto skutečností kontrastuje posun maxima (společného spektra obou Trp) do červené oblasti (více hydrofilního prostředí) v případě wt SPM v případě vazby Tb^{3+} (Obr. 13). Pokles intenzity tryptofanové fluorescence při vazbě Tb^{3+} wt SPM a mutantní variantou SPM-W519F tedy nemohl být vysvětlen pouhým nestandardním sbalením těchto proteinů, případně denurací vlivem vazby Tb^{3+} jako těžkého kovu (agregace SPM nastávala až při vyšší koncentraci Tb^{3+} , zhruba při 200 μM). Bylo nutné tomuto jevu věnovat více pozornosti. Aby bylo možné rozřešit nestandardní pokles intenzity fluorescence obou tryptofanů v wt SPM v přítomnosti Tb^{3+} , byla provedena analýza spekter jednotlivých tryptofanových reziduí, Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉, ve wt SPM během titrace Tb^{3+} pomocí spektrální dekonvoluce (Obr. 19). Jako výchozí hodnoty pro dekonvoluci sloužily přibližné pozice emisních maxim jednotlivých tryptofanů ve stejných koncentracích Tb^{3+} , hledaným parametrem byla intenzita fluorescence. Překvapivým výsledkem byl fakt, že příspěvek rezidua Trp₅₁₉ k celkové intenzitě wt SPM byl relativně nízký a při vyšší koncentraci Tb^{3+} postupně klesající až k nule. Současně reziduum Trp₅₁₉ v mutantním SPM-W451F vykazovalo pouze mírný pokles intenzity fluorescence (Obr. 20). Terciární konformace wt SPM s navázaným Tb^{3+} iontem se tedy skutečně může lokálně lišit ve srovnání s mutantním SPM-W451F. Změna intenzity Trp₅₁₉ (SPM-W451F) pak reálně neodrážela přesun tohoto rezidua do hydrofobnějšího prostředí v rámci wt SPM, jak by byl napovídá posun maxima emisního spektra do modré oblasti.

Nejjednodušším vysvětlením nenadálého poklesu intenzity tryptofanu je FRET mezi Trp a Tb^{3+} . Jako další krok bylo tedy nutné prošetřit FRET mezi tryptofany a Tb^{3+} , který by byl vzhledem k spektrálnímu překryvu umožněn, byla-li by mezi donorem a akceptorem energie vhodná vzdálenost, a mohl by vysvětlit pokles intenzity fluorescence tryptofanu po navázání Tb^{3+} .

Časově rozlišená spektroskopie ale potvrdila zkrácením průměrné doby života excitovaného stavu tryptofanu (vlivem rezonančního energetického přenosu)

v přítomnosti Tb^{3+} pouze u Trp_{451} (SPM-W519F), nikoliv u Trp_{519} (SPM-W451F). Podobná diskrepance byla pozorována také ve výsledku dekonvoluční analýzy, spolu se snížením intenzity fluorescence Trp_{519} v přítomnosti kteréhokoliv z iontů (Ca^{2+} a Tb^{3+}). U wt SPM a zejména u Trp_{519} (SPM-W451F) bylo ovšem naměřeno zkrácení jedné parciální doby života tryptofanu ve stavu s navázaným Tb^{3+} . Jedná se o dobu života excitovaného stavu s nízkou amplitudou, zkrácení tedy vzhledem k delší době života s vyšší amplitudou ve výsledku průměrné doby života excitovaného stavu přímočaře patrné. Podobně jako u jiných proteinů není konkrétní význam této komponenty znám, tryptofan v proteinech má zpravidla více dob života. To potvrdilo hypotézu, že nativní struktura vazebného místa pro iont wt SPM se mírně liší od vazebného místa SPM-W451F, i když si toto mutované vazebné místo zachovalo svou vazebnou funkci. Průměrná doba života excitovaného stavu Trp u wt SPM s Tb^{3+} se prodlužovala; z tohoto úhlu pohledu by toto prodloužení „lifetime“ u wt SPM vysvětlovalo výsledek dekonvoluční analýzy, kde byla fluorescence Trp_{519} zcela zhašena a díky majoritně přispívající delší době života excitovaného stavu Trp_{451} byla průměrná doba života fluorescence tryptofanů wt SPM odpovídající měrou prodloužena. Delší „lifetime“ je prakticky nepostižen, kratší hodně zkrácen a to se projevuje také snížením jeho příspěvku celkové intenzitě, tedy průměrná hodnota se více podobá delší komponentě, celkově se prodlužuje. Zvážením všech výsledků časově rozlišené i ustálené fluorescence spolu s výsledky výpočetní spektrální dekonvoluce bylo vyvozeno, že obě tryptofanová rezidua proteinu SPM se nachází v blízkosti vazebného místa pro Ca^{2+} , tedy i pro Tb^{3+} , a pravděpodobná vzdálenost mezi Trp_{451} a navázaným iontem Tb^{3+} je přibližně 6 Å. Oba tryptofany se navíc nacházejí ve vzájemné blízkosti umožňující migraci energie excitovaného stavu, která byla potvrzena pomocí měření časově rozlišené anizotropie fluorescence, tedy ve vzdálenosti okolo 5-7 Å. V publikaci (Liskova et al., 2016) byla nastíněna konfigurace vazebného místa SPM pro Ca^{2+} iont (Obr. 25), ve které jsou účastna obě rezidua tryptofanů Trp_{451} a Trp_{519} .



Obr. 25: Model π - π interakce zprostředkované vazbou Ca^{2+} . Ion Ca^{2+} iont (žlutá koule) je koordinován ligandy uvnitř vazebné smyčky pro Ca^{2+} , která je tvořena sekvencí (SPM₅₂₁₋₅₃₃) souhlasně s homologní sekvencí kanonického „EF-hand“ motivu (12aa). Smyčka nejspíš váže Ca^{2+} přes karboxylové a karbonylové postranní řetězce v poloze 1 (Asp₅₂₁), 3 (Asn₅₂₃), 5 (Asp₅₂₅), 9 (Gln₅₂₉) a 12 (Glu₅₃₃). Trp₅₁₉, umístěný jednu aa pozici před smyčkou, váže Ca^{2+} K^+ - σ vazbou (podél osy indolového kruhu). Boční řetězec Trp₄₅₁ je orientován téměř kolmo na Trp₅₁₉ a sdílí stejný Ca^{2+} pomocí interakce typu K^+ - π . Vzdálenosti (v Å) odpovídají experimentálně naměřeným hodnotám. Páteř polypeptidu je schematicky znázorněna jako hnědá čára, N- a C- konce SPM jsou znázorněny. Uhlík, dusík a vodík v postranních řetězcích Trp jsou oranžové, modré, a šedé.

Pro výpočet vzdálenosti bylo také stěžejní alespoň přibližné stanovení úhlu, který spolu vzájemně svírají tranziční dipóly obou tryptofanů, potažmo úhly svírané jejich normálovými vektory. Na tomto úhlu, spolu se vzájemnou vzdáleností, závisí možnost rezonančního přenosu energie v podobě veličiny κ^2 . To podnítilo náš zájem o jev příbuzný rezonančnímu přenosu energie a to π - π interakci, která může mezi rezidui tryptofanu ve vhodné konfiguraci nastat a pravděpodobně je také hybnou i stabilizační silou terciární struktury proteinů (π - π) (Burley and Petsko, 1985). Mnoho studií, které si vzaly za cíl stanovit nejčtetnější konfiguraci mezi planárními aminokyselinami s konjugovanými dvojnými vazbami a tedy možností stabilizovat svou proteinovou strukturu pomocí této elektrostatické interakce, přistoupila ke statistické analýze databáze proteinových struktur PDB (ProteinDataBank), avšak mnoho výzkumných skupin tuto problematiku z hlediska pravidel geometrie neuchopila zrovna šikovně. Nejčastějším zjištěním často bývá, že nejběžnější nacházený úhel mezi normálovými vektory rovin postranních řetězců aromatických

aminokyselin byl 90° . To je v literatuře často interpretováno jako silná tendence těchto aromatických skupin interagovat vzájemně v kolmém uspořádání. V pracích jsou pak prezentovány gaussovske křivky proložené histogramem četností nacházených úhlů mezi různými osami aminokyselin. To nahrává domněnce, že stabilizace proteinových struktur pomocí π - π interakce je snad nejhojněji využívanou interakcí v přírodě. Skutečnost je však spíše taková, že aminokyseliny nacházené nejčastěji pod vzájemným úhlem 90° nemusí nutně nijak specificky interagovat (podobné orientace budeme nacházet i u molekul velmi vzdálených). Popsaná úhlová závislost pouze popisuje skutečnost, že v ekvatoriální rovině okolo objektu (úhel normálových vektorů 90°) je největší stupeň volnosti všech ostatních úhlů, které popisují objekt-molekulu v kartézské soustavě souřadnic na sebe navzájem kolmých (xyz). Jedná se tedy pouze o podmíněnou pravděpodobnost. V připravované publikaci jsme se tuto domněnku snažili vyvrátit. Analyzováním proteinových struktur PDB jsme zjistili, že vzájemná konfigurace dvou blízkých tryptofanů v jednom proteinu podléhá několika zákonitostem, které nutně nesouvisí s π - π interakcí.

Jako jednou z metod zjišťování vazebných parametrů SMP bylo použito také nahrávání excitačních spekter Tb^{3+} . Kromě náhledu, že Tb^{3+} je vázáno do blízkosti Trp₅₁₉, který je součástí předběžně předpokládaného vazebného místa na základě homologie s motivem „EF-hand“, bylo také zřejmé, že excitační spektrum Tb^{3+} je variabilní a závislé na stavu, ve kterém se Tb^{3+} nachází. Těmito experimenty byla tato predikce potvrzena. Velmi jednoduchým postupem, jakým je nahrávání excitačních spekter, je možné rozlišit stav, v jakém se Tb^{3+} nachází (volné, vázané, vázané s možným přenosem energie z Trp). V případě vazby Tb^{3+} na SPM je situace složitější, protože SPM váže až 5 iontů Tb^{3+} , které jsou pravděpodobně vázány do více vazebných míst, která si nemusí být podobná (neposkytují stejnou míru odstínění molekul vody, které mají na fosforescenci Tb^{3+} zhášecí efekt). V případě SPM se tedy jedná o směs různých stavů Tb^{3+} a tedy i o kombinaci různých excitačních maxim. V případě peptidu AFQ se až do koncentrace $30\ \mu M$ neprojeví přítomnost excitačních maxim samotného terbia, vázaného, ani volného Tb^{3+} . Detekce vazby iontu do struktury vazebného místa na AFQ peptidu je umožněna pomocí spektra odpovídajícího excitačnímu spektru Trp s maximem $284\ nm$. Jelikož je peptid AFQ velmi krátký, není patrně schopen vytvořit dostatečně hydrofobní kapsu a fosforescence Tb^{3+} je zhášena molekulami vody. Je tedy možné, že ve

vazbě Tb^{3+} působí mechanismus $\text{K}^+-\pi$ interakce, která pozmění dostupnost elektronů v elektronovém obalu Tb^{3+} a dokud je Tb^{3+} kvantitativně vyvázáno na AFQ peptid, nemůže se projevit jiným elektronovým přechodem, než náležícím k excitaci pomocí přenosu energie z Trp. Jedno z předpovězených vazebných míst v rámci proteinu FrpC, které svou strukturou pravděpodobně odpovídá „EF-hand“ vazebnému motivu, tímto bylo potvrzeno.

6 Souhrn

Tato práce se zabývá převážně řešením konsekvencí strukturních a vazebných atributů proteinu SPM s použitím metod fluorescenční spektroskopie. V této souvislosti byly použity dvě mutantní varianty SPM nesoucí pouze jedno reziduum tryptofan. U všech tří variant SPM (wt SPM, W451F a W519F) byla popsána vazba kovového iontu do struktury SPM a bylo zjištěno, že substituce tryptofanu za fenylalanin neovlivnila parametry vazebných míst pro Ca^{2+} , protože disociační konstanta K_D se pohybuje u všech proteinů okolo 17 μM . Vazebné pokusy se prováděly s použitím Tb^{3+} , tedy vazebného analogu Ca^{2+} iontu, kdy bylo potvrzeno, že použití Tb^{3+} je adekvátní a funkční a že ionty Tb^{3+} plně obsazují vazebná místa pro Ca^{2+} a jsou si navzájem ekvivalentní i ve své funkci, tedy ve sbalování proteinu, které je zcela závislé právě na vazbě kovového iontu. S použitím krátkého peptidu AFQ bylo také potvrzeno, že předpovězené vazebné místo, které bylo určeno pomocí homologie s vazebným motivem „EF-hand“ a nachází se v blízkosti rezidua Trp₅₁₉, je skutečně strukturně schopné navázat iont Tb^{3+} . Vzhledem k tomu, jak je sekvence AFQ peptidu krátká, dochází také k vazbě Tb^{3+} v blízkosti tohoto tryptofanového rezidua. V rámci struktury vazebného místa pro kovové ionty v SPM bylo zjištěno, že se alespoň jeden iont Tb^{3+} se zde váže do oblasti blízké reziduu Trp₄₅₁ (5 Å). Bylo také uzavřeno, že struktura vazebného místa, kromě dalších, je tvořena oběma rezidui Trp, která jsou ve vzájemné blízkosti 5-7 Å. Tyto skutečnosti pomáhají spoluvytvářet model součinnosti vazby kovového iontu do vazebných míst SPM a sbalování proteinu SPM, jehož hnací silou jsou elektrostatické vazby obou aromatických bočních řetězců Trp₄₅₁-Trp₅₁₉ typu π - π interakce a vazba kovového iontu do blízkosti aromatického bočního řetězce Trp₄₅₁ pomocí elektrostatické interakce typu K^+ - π .

7 Seznam publikací

7.1 Prvoautorské publikace

Probing the Ca^{2+} -assisted π - π interaction during Ca^{2+} -dependent protein folding

Petra Matyska Lišková, Radovan Fišer, Pavel Macek, Josef Chmelík, Jan Sýkora, Lucie Bednárová, Ivo Konopásek, Ladislav Bumba

Soft Matter 12 (2): 531–41, 2016

DOI: 10.1039/C5SM01796C

Citováno: 2

IF: 3.889 (2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, June 2017))

Diamond nanoparticles suppress lateral growth of bacterial colonies

Petra Matyska Lišková, Jana Beranová, Egor Ukraintsev, Radovan Fišer, Olga Kofroňová, Oldřich Benada, Ivo Konopásek, Alexander Kromka

Colloids and Surfaces B – Biointerfaces

Přijato: 26.6.2018

IF: 3.887 (2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, June 2017))

7.2 Spoluautorské publikace

Transmembrane Segments Of Complement receptor 3 Do Not Participate In Cytotoxic Activities But Determine Receptor Structure Required For Action Of *Bordetella* Adenylate cyclase toxin

Tomáš Wald, Adriana Osičková, Jiří Mašín, Petra Matyska Lišková, Inga Petry-Podgorska, Tomáš Matoušek, Peter Šebo, Radim Osička

Pathogens and Disease 74 (3), 2016

DOI: 10.1093/femspd/ftw008

Citováno: 3

IF: 2.335 (2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, 2017))

Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in *Bacillus subtilis*

Kateřina Vaňousová, Jana Beranová, Radovan Fiřer, Malgorzata Jemioła-Rzemińska, Petra Matyska Liřková, Larisa Cybulski, Kazimierz Strzałka, Ivo Konopásek

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1860 (3): 718–27, 2018

DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.12.015.

Citováno: 0

IF: 3.498 (2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, 2017))

Anti-adhesive properties of nanocrystalline diamond films against *Escherichia coli* bacterium: Influence of surface termination and cultivation medium

Jakub Budil, Petra Matyska Liřková, Anna Artemenko, Egor Ukrainsev, Ivan Gordeev, Jana Beranová, Ivo Konopásek, Alexander Kromka

Diamond and Related Materials 83 (March): 87–93, 2018

DOI: 10.1016/j.diamond.2018.02.001

Citováno: 0

IF: 2.561 (2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, 2017))

7.3 Publikace v recenzním řízení

Simple way to detect Trp to Tb³⁺ resonance energy transfer in calcium-binding peptides using excitation spectrum

Petra Liřková, Ivo Konopásek, Radovan Fiřer

v recenzním řízení: Journal of Fluorescence

Daptomycin pore formation and stoichiometry depends on membrane potential of target membrane

Gabriela Seydlová, Albert Sokol, Petra Liřková, Ivo Konopásek, Radovan Fiřer

v recenzním řízení: Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Příloha 1: „Probing the Ca²⁺ assisted π - π interaction during Ca²⁺-dependent protein folding“

Petra Matyska Lišková, Radovan Fišer, Pavel Macek, Josef Chmelík, Jan Sýkora, Lucie Bednářová, Ivo Konopásek, Ladislav Bumba; *Soft Matter* 12 (2): 531–41, 2016; DOI: 10.1039/C5SM01796C

Tato publikace pojednává o enzymaticky aktivním segmentu SPM proteinu FrpC, který je produkován bakterií *Neisseria meningitidis*. Pomocí fluorescenční spektroskopie (vnitřní fluorescence Trp) a spektroskopie cirkulárního dichroismu je popsána dynamika sbalování SPM, kdy v mediu prostém Ca²⁺ je SPM ve zcela rozvolněném stavu, po přidání Ca²⁺ se postupně sbaluje a získává nativní konformaci nutnou pro enzymatickou aktivitu. S využitím iontu Tb³⁺, vazebného analogu Ca²⁺, umožňujícího rovněž sbalování SPM, je stanovena disociační konstanta vazebného místa pro kovový iont. Současně jsou mapovány vlastnosti vazebného místa pro kovový iont; ve sbaleném stavu je umožněn rezonanční energetický přenos (FRET) z Trp₄₅₁ na navázané Tb³⁺, pomocí časově rozlišené fluorescence Trp je stanovena vzdálenost Trp₄₅₁ k navázanému Tb³⁺ na 5 Å. Současně je také potvrzena vzájemná blízkost obou tryptofanů (Trp₄₅₁ a Trp₅₁₉) na přibližně 5-7 Å ve sbaleném SPM, kdy pomocí časově rozlišené anizotropie Trp při současné imobilizaci SPM v zamrzlém roztoku byl stanoven rezonanční energetický přenos mezi oběma Trp (homoFRET). Blízkost obou Trp je potvrzena pomocí CD spektroskopie ve vzdálené UV oblasti, kde se ve sbaleném stavu pouze u wt SPM (které nese oba Trp) objevuje maximum při 228 nm a současně minimum při 213 nm, naznačující tzv. exciton coupling, tedy kvadrupolovou interakci dvou blízkých aromatických molekul (Trp), které sdílí své π elektrony.

Příloha 2: „Transmembrane Segments Of Complement receptor 3 Do Not Participate In Cytotoxic Activities But Determine Receptor Structure Required For Action Of Bordetella Adenylate cyclase toxin“

Tomáš Wald, Adriana Osičková, Jiří Mašín, Petra Matyska Lišková, Inga Petry-Podgorska, Tomáš Matoušek, Peter Šebo, Radim Osička; *Pathogens and Disease* 74 (3), 2016; DOI: 10.1093/femspd/ftw008

V této publikaci je sledován vliv domén receptoru CR 3 (complement receptor 3, integrin CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$, Mac-1) jdoucích skrz membránu fagocytujících buněk imunitního systému na cytotoxickou aktivitu proteinu CyaA, adenylátcyklázový toxin (RTX protein vázající vápník) bakterie *Bordetella pertussis*. Prvotním cílem proteinu CyaA jsou hostitelské myeloidní buňky (polymorfonukleární leukocyty, mononukleární fagocyty), které mají na svém povrchu receptor CR 3 (rozpoznává různé molekuly nacházející se na povrchu bakterií). CR 3 receptor je heterodimer podjednotek $\alpha_M\beta_2$, obě tyto podjednotky se skládají z N-koncové extracelulární domény, α -helikální domény jdoucí skrz membránu a krátké C-koncové intracelulární domény. V rámci experimentů byly konstruovány mutantní receptory CR 3 s arteficiální transmembránovou doménou (transmembránové motivy CD11b a CD18 byly zaměněny za motivy hydrofobního α -helixu glykoporinu A, dále také receptoru VEGFR-2, případně byly zaměněny za GPI kotvu nebo zcela deletovány). Výsledkem této práce je závěr, že specifické transmembránové oblasti receptoru CR 3 nejsou přímo účastny ve vazbě proteinu CyaA, nejsou stěžejní pro translokaci AC (adenylátcyklázové domény CyaA), ani pro tvorbu oligomerního póru CyaA. Transmembránový segment CR 3 receptoru je však důležitý pro konformaci receptoru (otevřená či uzavřená), což je stěžejní pro vazebnou kapacitu CR 3 receptoru pro protein CyaA.

Příloha 3: „Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in Bacillus subtilis“

Kateřina Vaňousová, Jana Beranová, Radovan Fišer, Malgorzata Jemioła-Rzemińska, Petra Matyska Lišková, Larisa Cybulski, Kazimierz Strzałka, Ivo Konopásek; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860 (3): 718–27, 2018; DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.12.015.

V této práci byl zkoumán vliv a změny biofyzikálních charakteristik (fluidita) membrány *Bacillus subtilis* na membránový senzor DesK, jehož úkolem je zaznamenat snížení membránové fluidity a spuštěním kaskády signální transdukce pak regulovat membránovou desaturázu, která umožňuje následné zvýšení fluidity membrány v nižších teplotách. Arteficiální změny fluidity membrány byly umožněné přidavky lineárních alkoholů. Bylo zjištěno, že zvýšená membránová fluidita, která byla způsobena přidavky alkoholů, zvýšila také hydrataci rozhraní lipid-voda, což bylo provázeno poklesem aktivity senzoru DesK. Přidavky alkoholů do membrány, které napodobují zvýšení teploty, působí na okrajové části transmembránové domény senzoru DesK, která funguje jako molekulární měřítko a je tak schopna zaznamenat změny vlastností membrány.

Příloha 4: „Anti-adhesive properties of nanocrystalline diamond films against Escherichia coli bacterium: Influence of surface termination and cultivation medium“

Jakub Budil, Petra Matyska Lišková, Anna Artemenko, Egor Ukraintsev, Ivan Gordeev, Jana Beranová, Ivo Konopásek, Alexander Kromka; *Diamond and Related Materials* 83 (March): 87–93, 2018; DOI: 10.1016/j.diamond.2018.02.001

V této práci byl testován vliv povrchové úpravy filmů tvořených nanokrystalickým diamantem (NCD; H-NCD, O-NCD, F-NCD) na antiadhezivní vlastnosti namířené proti bakteriálnímu biofilmu tvořenému *Escherichia coli* a také vliv kultivačního media (komplexní medium Luria-Bertani a minerální medium M9) na antiadhezivní vlastnosti těchto filmů. Bylo zjištěno, že vlastnosti NCD nezávisí na povrchu, na nějž jsou deponovány (sklo, křemík). Antiadhezivní vliv NCD byl zaznamenán pouze v případě minerálního media a povrchů terminovaných vodíkem nebo fluorem. V komplexním mediu dochází k adhezi organických molekul na povrch NCD, bakteriální buňky následně nasedají na kondiční film tvořený molekulami z media a ke kontaktu s NCD tak prakticky nedochází.

Příloha 5: „Diamond nanoparticles suppress lateral growth of bacterial colonies“

Petra Matyska Lišková, Jana Beranová, Egor Ukraintsev, Radovan Fišer, Olga Kofroňová, Oldřich Benada, Ivo Konopásek, Alexander Kromka

V této publikaci, která je v současnosti již přijatá k publikování, je popsán vliv diamantových nanočástic na růst bakteriálních kolonií na agarem zpevněném mediu. V současné době výzkum nanočástic zaznamenal značný rozvoj, uhlíkové nanočástice různé hybridizace, stavby, velikosti i morfologie (diamant, grafenoxid, redukovaný grafenoxid, uhlíkové nanotrubičky) jsou testovány s ohledem na jejich antibakteriální potenciál. Zkoumána je zpravidla antibakteriální aktivita materiálů v suspenzi pomocí následného výsevu bakteriální suspenze na misky a počítání CFU (colony forming units). Spolu s výsevem bakterií jsou ovšem také vysévány nanočástice, které není možné ze suspenze odstranit, ani dostatečně vyředit. V této práci je popsán inhibiční vliv diamantových nanočástic (DNP) o průměrné velikosti 5 nm rozprostřených na agarem zpevněné medium na růst bakteriální kolonie u *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a *Proteus mirabilis*. DNP na povrchu ovlivňují velikost kolonie, rychlost růstu, celkovou biomasu. Vzhledem k tomu, že byla zaznamenána nejmarkantnější změna velikosti kolonie u *P. mirabilis*, který je za daných podmínek schopen pohybu (invazovní růst, swarming) a že jiné sledované charakteristiky (změna morfologie kolonie, změna morfologie buněk, možnost absorpce živin z media na diamanty) přidanými DNP nebyly pozorovány, dá se uzavřít, že růst kolonie na pevném mediu je DNP ovlivněn pouze fyzicky; diamantové nanočástice jsou především mechanickou bariérou omezující laterální expanzi kolonie na zpevněném mediu.

Příloha 6: „Simple way to detect Trp to Tb³⁺ resonance energy transfer in calcium-binding peptides using excitation spectrum“

Petra Lišková, Ivo Konopásek, Radovan Fišer

V této publikaci (v recenzním řízení) je popsáno, že pomocí kvantifikace rozložení maxim v excitačním spektru Tb³⁺ může být rozlišeno, v jakém stavu se ionty Tb³⁺ nachází; zda jsou volné v roztoku (s dominujícími excitačními maximy na 266 nm a nad 320 nm), zda jsou ionty vázány do hydrofobního vazebného místa (s dominujícím maximem při 243 nm), nebo je umožněna excitace pomocí rezonančního přenosu energie z Trp, který se nachází v blízkosti navázaného iontu Tb³⁺. Detekce je umožněna i přes velmi nízký molární extinkční koeficient Tb³⁺ a nízké kvantové výtěžky fosforescence Tb³⁺ i ve velmi nízkých koncentracích Tb³⁺. Současným nahráváním excitačních spekter v maximu emise (545 nm) a při vlnových délkách na obou okrajích tohoto spektra (525 nm a 565 nm) a následným odečtením průměrného pozadí fosforescence je možné spolehlivě kvantifikovat i malé absolutní intenzity, což je umožněno tím, že emisní maximum Tb³⁺ (545 nm) je velmi úzké.

Příloha 7: „Daptomycin pore formation and stoichiometry depends on membrane potential of target membrane“

Gabriela Seydlová, Albert Sokol, Petra Lišková, Ivo Konopásek, Radovan Fišer

Daptomycin je lipopeptidové antibiotikum, jehož působení je závislé na přítomnosti Ca^{2+} . Ačkoliv je daptomycin již klinicky využíván pro léčbu závažných infekcí způsobených Gram-pozitivními bakteriemi, literární zdroje se však úplně neshodují ve vysvětlení mechanismu jeho účinku, který byl zkoumán především na in vitro systémech, konkrétně na liposomech. Nejpravděpodobněji daptomycin po navázání Ca^{2+} vytváří oligomery v membráně, kde vytváří póry, a způsobí depolarizaci membrány, což je možné prokázat mimo jiné např. únikem fluorescenční sondy z lipozomů. Dále daptomycin mění membránovou fluiditu a mění strukturu membránových mikrodomén. V této práci, která je v recenzním řízení, jsou shrnuty účinky daptomycinu a je potvrzeno, že daptomycin tvoří in vitro póry v umělých membránách. Avšak velikost pórů (vodivostní stav) a počet funkčních pórů závisí na napětí, které je vloženo na membránu. Podobná závislost nebyla dříve pozorována, neboť membránový potenciál se na liposomech velmi těžko ustanovuje. V přiložené práci je současně prokázáno, že pro účinek daptomycinu in vivo na modelu *Bacillus subtilis* je nutný vysoký membránový potenciál, který je v následku inkorporace antibiotika do membrány a následné dezorganizace a permeabilizace membrány zkracován.

8 Seznam citované literatury

- Aitio, H., Annala, A., Heikkinen, S., Thulin, E., Drakenberg, T., Kilpeläinen, I., 1999. NMR assignments, secondary structure, and global fold of calerythrin, an EF-hand calcium-binding protein from *Saccharopolyspora erythraea*. *Protein Sci.* 8, 2580–2588. <https://doi.org/10.1110/ps.8.12.2580>
- Basler, M., Linhartová, I., Halada, P., Novotná, J., Bezoušková, S., Osička, R., Weiser, J., Vohradský, J., Šebo, P., 2006. The iron-regulated transcriptome and proteome of *Neisseria meningitidis* serogroup C. *PROTEOMICS* 6, 6194–6206. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600312>
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., McKay, D.B., 1993. Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12, 3357–3364.
- Berka, K., Laskowski, R.A., Hobza, P., Vondrasek, J., 2010. Energy Matrix of Structurally Important Side-Chain/Side-Chain Interactions in Proteins. *J. Chem. Theory Comput.* 6, 2191–2203. <https://doi.org/10.1021/ct100007y>
- Bradford, M., 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., Svergun, D.I., Barinka, C., Sebo, P., 2016. Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* 62, 47–62. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.018>
- Burley, S., Petsko, G., 1988. Weakly Polar Interactions in Proteins. *Adv. Protein Chem.* 39, 125–189.
- Burley, S., Petsko, G., 1985. Aromatic-Aromatic Interaction - a Mechanism of Protein-Structure Stabilization. *Science* 229, 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.3892686>
- Burley, S.K., Petsko, G.A., 1986. Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Letters* 203, 139–143. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80730-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80730-X)
- Burstein, E.A., Abornev, S.M., Reshetnyak, Y.K., 2001. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms. *Biophys. J.* 81, 1699–1709.
- Caldwell, C.R., 1989. Analysis of aluminum and divalent cation binding to wheat root plasma membrane proteins using terbium phosphorescence. *Plant Physiol.* 91, 233–241.
- Canada, R.G., Paltoo, D.N., 1998. Binding of terbium and cisplatin to C13* human ovarian cancer cells using time-resolved terbium luminescence. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1448, 85–98. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00127-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00127-X)
- Chang, C.F., Shuman, H., Somlyo, A.P., 1986. Electron probe analysis, X-ray mapping, and electron energy-loss spectroscopy of calcium, magnesium, and monovalent ions in log-phase and in dividing *Escherichia coli* B cells. *J. Bacteriol.* 167, 935–939.
- Chen, Y., Barkley, M.D., 1998. Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry* 37, 9976–9982. <https://doi.org/10.1021/bi980274n>

- Chenal, A., Guijarro, J.I., Raynal, B., Delepierre, M., Ladant, D., 2009. RTX Calcium Binding Motifs Are Intrinsically Disordered in the Absence of Calcium IMPLICATION FOR PROTEIN SECRETION. *J. Biol. Chem.* 284, 1781–1789. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807312200>
- Chenal, A., Karst, J.C., Perez, A.C.S., Wozniak, A.K., Baron, B., England, P., Ladant, D., 2010. Calcium-Induced Folding and Stabilization of the Intrinsically Disordered RTX Domain of the CyaA Toxin. *Biophys. J.* 99, 3744–3753. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.016>
- De Wall, S.L., Meadows, E.S., Barbour, L.J., Gokel, G.W., 1999. Solution- and solid-state evidence for alkali metal cation- π interactions with indole, the side chain of tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5613–5614. <https://doi.org/10.1021/ja9907921>
- Dominguez, D.C., 2004. Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* 54, 291–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04276.x>
- Dougherty, D.A., 1996. Cation- π Interactions in Chemistry and Biology: A New View of Benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271, 163–168. <https://doi.org/10.1126/science.271.5246.163>
- Eisinger, J., 1969. Intramolecular energy transfer in adrenocorticotropin. *Biochemistry* 8, 3902–3908.
- Falke, J.J., Drake, S.K., Hazard, A.L., Peersen, O.B., 1994. Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Q. Rev. Biophys.* 27, 219–290.
- Forman, S., Linhartova, I., Osicka, R., Nassif, X., Sebo, P., Pelicic, V., 2003. *Neisseria meningitidis* RTX proteins are not required for virulence in infant rats. *Infect. Immun.* 71, 2253–2257. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2253-2257.2003>
- Förster, T., 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann. Phys.-Berlin* 2, 55–75.
- Frey, J., Meier, R., Gygi, D., Nicolet, J., 1991. Nucleotide-Sequence of the Hemolysin-I Gene from *Actinobacillus-Pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 59, 3026–3032.
- Gallivan, J.P., Dougherty, D.A., 1999. Cation- π interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9459–9464.
- Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G., Genco, C.A., 2003. Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *PNAS* 100, 9542–9547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1033001100>
- Grishina, I., Woody, R., 1994. Contributions of Tryptophan Side-Chains to the Circular-Dichroism of Globular-Proteins - Exciton Couplets and Coupled Oscillators. *Faraday Discuss.* 99, 245–262. <https://doi.org/10.1039/fd9949900245>
- Gross, M.D., Nelsestuen, G.L., Kumar, R., 1987. Observations on the binding of lanthanides and calcium to vitamin D-dependent chick intestinal calcium-binding protein. Implications regarding calcium-binding protein function. *J. Biol. Chem.* 262, 6539–6545.
- Guo, L., Yan, B., Liu, J.-L., Sheng, K., Wang, X.-L., 2011. Coordination bonding construction, characterization and photoluminescence of ternary lanthanide (Eu^{3+} , Tb^{3+}) hybrids with phenylphenacyl-sulfoxide modified bridge and polymer units. *Dalton Transactions* 40, 632–638. <https://doi.org/10.1039/C0DT00981D>

- Gurd, F.R., Wilcox, P.E., 1956. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides and amino acids. *Adv. Protein Chem.* 11, 311–427.
- Hill, A.V., 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology, PROCEEDINGS OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY* 40, i–vii. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1910.sp001386>
- Hofmann, T., Eng, S., Lilja, H., Drakenberg, T., Vogel, H.J., Forsén, S., 1988. Site-site interactions in EF-hand calcium-binding proteins. Laser-excited europium luminescence studies of 9-kDa calbindin, the pig intestinal calcium-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 172, 307–313.
- Hogue, C.W., MacManus, J.P., Banville, D., Szabo, A.G., 1992. Comparison of terbium (III) luminescence enhancement in mutants of EF hand calcium binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 13340–13347.
- Horrocks, W.D., 1982. Lanthanide Ion Probes of Biomolecular Structure. *Advances in Inorganic Biochemistry* 4, 201–261.
- Horrocks, W.D., Collier, W., 1981. Lanthanide Ion Luminescence Probes - Measurement of Distance Between Intrinsic Protein Fluorophores and Bound Metal-Ions - Quantitation of Energy-Transfer Between Tryptophan and Terbium(III) or Europium(III) in the Calcium-Binding Protein Parvalbumin. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2856–2862.
- Hunter, C.A., Sanders, J.K.M., 1990. The nature of pi-pi interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 5525–5534. <https://doi.org/10.1021/ja00170a016>
- Ichiye, T., Karplus, M., 1983. Fluorescence Depolarization of Tryptophan Residues in Proteins - a Molecular-Dynamics Study. *Biochemistry* 22, 2884–2893. <https://doi.org/10.1021/bi00281a017>
- Jiao, M., Guo, N., Lü, W., Jia, Y., Lv, W., Zhao, Q., Shao, B., You, H., 2013. Synthesis, structure and photoluminescence properties of europium-, terbium-, and thulium-doped $\text{Ca}_3\text{Bi}(\text{PO}_4)_3$ phosphors. *Dalton Transactions* 42, 12395–12402. <https://doi.org/10.1039/C3DT50552A>
- Kawasaki, H., Kretsinger, R.H., 1994. Calcium-binding proteins. 1: EF-hands. *Protein Profile* 1, 343–517.
- Kawasaki, H., Nakayama, S., Kretsinger, R.H., 1998. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* 11, 277–295.
- Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L., 2011. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79, 548–561. <https://doi.org/10.1128/IAI.00682-10>
- Kretsinger, R.H., Nockolds, C.E., 1973. Carp Muscle Calcium-binding Protein II. STRUCTURE DETERMINATION AND GENERAL DESCRIPTION. *J. Biol. Chem.* 248, 3313–3326.
- Kubáň, V., Nováček, J., Bumba, L., Židek, L., 2015. NMR assignment of intrinsically disordered self-processing module of the FrpC protein of *Neisseria meningitidis*. *Biomol NMR Assign* 9, 435–440. <https://doi.org/10.1007/s12104-015-9625-z>
- Ladokhin, A.S., 2000. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis, in: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a1611>
- Lakowicz, J., Maliwal, B., Cherek, H., Balter, A., 1983. Rotational Freedom of Tryptophan Residues in Proteins and Peptides. *Biochemistry* 22, 1741–1752. <https://doi.org/10.1021/bi00277a001>
- Lakowicz, J.R., 2007. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer.

- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., Korostoff, J., 1999. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7, 356–361.
- Lewit-Bentley, A., Réty, S., 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 637–643. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00142-1)
- Li, Y.T., Yang, C.M., 2005. A tryptophan-containing open-chain framework for tuning a high selectivity for Ca²⁺ and C-13 NMR observation of a Ca²⁺-indole interaction in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3527–3530. <https://doi.org/10.1021/ja046517i>
- Linhartova, I., Basler, M., Ichikawa, J., Pelicic, V., Osicka, R., Lory, S., Nassif, X., Sebo, P., 2006. Meningococcal adhesion suppresses proapoptotic gene expression and promotes expression of genes supporting early embryonic and cytoprotective signaling of human endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 263, 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00407.x>
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J., Sebo, P., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *Fems Microbiol. Rev.* 34, 1076–1112. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x>
- Liskova, P.M., Fiser, R., Macek, P., Chmelik, J., Sykora, J., Bednarova, L., Konopasek, I., Bumba, L., 2016. Probing the Ca²⁺-assisted pi-pi interaction during Ca²⁺-dependent protein folding. *Soft Matter* 12, 531–541. <https://doi.org/10.1039/c5sm01796c>
- Ma, W., Hwang, K.J., Lee, V.H., 1993. A fluorescence quenching method for estimating chelating groups in chelate-conjugated macromolecules. *Pharm. Res.* 10, 204–207.
- McGaughey, G.B., Gagné, M., Rappé, A.K., 1998. pi-Stacking interactions: Alive and well in proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 15458–15463.
- Miller, T.L., Bennett, L.W., Spatz, D.S., 1986. Terbium Luminescence from Complexes of Angiotensin II, Small Peptides, and Amino Acids 5.
- Nalefski, E.A., Falke, J.J., 1996. The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 5, 2375–2390. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
- Nelson, M.R., Chazin, W.J., 1998. Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals* 11, 297–318.
- Ohara, P., 1987. Lanthanide Ions as Luminescent Probes of Biomolecular Structure. *Photochem. Photobiol.* 46, 1067–1070. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb04894.x>
- Ohmae, E., Sasaki, Y., Gekko, K., 2001. Effects of five-tryptophan mutations on structure, stability and function of Escherichia coli dihydrofolate reductase. *J. Biochem. (Tokyo)* 130, 439–447.
- Omori, K., Idei, A., 2003. Gram-negative bacterial ATP-binding cassette protein exporter family and diverse secretory proteins. *J. Biosci. Bioeng.* 95, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80141-X](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80141-X)
- Ordal, G.W., 1977. Calcium ion regulates chemotactic behaviour in bacteria. *Nature* 270, 66–67. <https://doi.org/10.1038/270066a0>
- Osicka, R., Kalmusova, J., Krizova, P., Sebo, P., 2001. Neisseria meningitidis RTX protein FrpC induces high levels of serum antibodies during invasive disease:

- Polymorphism of *frpC* alleles and purification of recombinant FrpC. *Infect. Immun.* 69, 5509–5519.
- Osicka, R., Prochazkova, K., Sulc, M., Linhartova, I., Havlicek, V., Sebo, P., 2004. A novel “clip-and-link” activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens - Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J. Biol. Chem.* 279, 24944–24956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314013200>
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K.E., Wolf-Watz, H., 1996. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* 273, 1231–1233.
- Prochazkova, K., Osicka, R., Linhartova, I., Halada, P., Sulc, M., Sebo, P., 2005. The *Neisseria meningitidis* Outer Membrane Lipoprotein FrpD Binds the RTX Protein FrpC. *J. Biol. Chem.* 280, 3251–3258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411232200>
- Sadilkova, L., Osicka, R., Sulc, M., Linhartova, I., Novak, P., Sebo, P., 2008. Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC. *Protein Sci.* 17, 1834–1843. <https://doi.org/10.1110/ps.035733.108>
- Schwaller, B., 2001. Calcium-binding Proteins, in: ELS. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001347>
- Sharma, S.K., Goloubinoff, P., Christen, P., 2008. Heavy metal ions are potent inhibitors of protein folding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.052>
- Sinnokrot, M.O., Valeev, E.F., Sherrill, C.D., 2002. Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: the benzene dimer. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 10887–10893.
- Soloaga, A., Ostolaza, H., Goñi, F.M., de la Cruz, F., 1996. Purification of *Escherichia coli* pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin. *Eur. J. Biochem.* 238, 418–422.
- Spies, J.R., 1967. Determination of tryptophan in proteins. *Analytical Chemistry* 39, 1412–1416. <https://doi.org/10.1021/ac60256a004>
- Sviridova, E., Rezacova, P., Bondar, A., Veverka, V., Novak, P., Schenk, G., Svergun, D.I., Kuta Smatanova, I., Bumba, L., 2017. Structural basis of the interaction between the putative adhesion-involved and iron-regulated FrpD and FrpC proteins of *Neisseria meningitidis*. *Scientific Reports* 7, 40408. <https://doi.org/10.1038/srep40408>
- Thompson, S.A., Wang, L.L., West, A., Sparling, P.F., 1993. *Neisseria meningitidis* produces iron-regulated proteins related to the RTX family of exoproteins. *J. Bacteriol.* 175, 811–818. <https://doi.org/10.1128/jb.175.3.811-818.1993>
- Toptygin, D., Gronenborn, A.M., Brand, L., 2006. Nanosecond relaxation dynamics of protein GB1 identified by the time-dependent red shift in the fluorescence of tryptophan and 5-fluorotryptophan. *J. Phys. Chem. B* 110, 26292–26302. <https://doi.org/10.1021/jp064528n>
- Toptygin, D., Savtchenko, R.S., Meadow, N.D., Brand, L., 2001. Homogeneous Spectrally- and Time-Resolved Fluorescence Emission from Single-Tryptophan Mutants of IIAGlc Protein. *J. Phys. Chem. B* 105, 2043–2055. <https://doi.org/10.1021/jp003405e>
- Torrecilla, I., Leganés, F., Bonilla, I., Fernández-Piñas, F., 2001. Calcium transients in response to salinity and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120, expressing cytosolic apoaequorin.

- Plant, Cell & Environment 24, 641–648. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00708.x>
- Tran, T.H., Tran, K.A., Hoang, T.K., Pham, T.H., Le, Q.M., 2012. Fabrication and properties of terbium phosphate nanorods. *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 3, 015010. <https://doi.org/10.1088/2043-6262/3/1/015010>
- Vincent, M., Gilles, A.-M., Li de la Sierra, I.M., Briozzo, P., Bârză, O., Gallay, J., 2000. Nanosecond Fluorescence Dynamic Stokes Shift of Tryptophan in a Protein Matrix. *J. Phys. Chem. B* 104, 11286–11295. <https://doi.org/10.1021/jp000638x>
- Waditee, R., Hossain, G.S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, Tetsuko, Takabe, Teruhiro, 2004. Isolation and functional characterization of Ca²⁺/H⁺ antiporters from cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 279, 4330–4338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310282200>
- Wallace, R.W., Tallant, E.A., Dockter, M.E., Cheung, W.Y., 1982. Calcium binding domains of calmodulin. Sequence of full as determined with terbium luminescence. *J. Biol. Chem.* 257, 1845–1854.
- Welch, R.A., 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521–528.
- Wojdyr, M., 2010. Fityk: a general-purpose peak fitting program. *J Appl Cryst, J Appl Crystallogr* 43, 1126–1128. <https://doi.org/10.1107/S0021889810030499>
- Yamamoto, Y., Tanaka, J., 1972. Polarized Absorption Spectra of Crystals of Indole and Its Related Compounds. *BCSJ* 45, 1362–1366. <https://doi.org/10.1246/bcsj.45.1362>
- Ye, Y., Lee, H.W., Yang, W., Shealy, S.J., Wilkins, A.L., Liu, Z.R., Torshin, I., Harrison, R., Wohlueter, R., Yang, J.J., 2001. Metal binding affinity and structural properties of an isolated EF-loop in a scaffold protein. *Protein Eng.* 14, 1001–1013.
- Yu, X.C., Margolin, W., 1997. Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J* 16, 5455–5463. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5455>
- Zhou, Y., Yang, W., Kirberger, M., Lee, H.-W., Ayalasomayajula, G., Yang, J.J., 2006. Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins* 65, 643–655. <https://doi.org/10.1002/prot.21139>

9 Přílohy